

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. M. Reincke

Interferon-Induktion durch Triphosphat-RNA

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Jana Ellegast

aus Nürnberg

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Becker

Mitberichtersteller: Prof. Dr. T. Brocker
Prof. Dr. Dr. h.c. U. Koszinowski

Betreuung durch: Prof. Dr. V. Hornung

Dekan: Prof. Dr. Dr.h.c. M. Reiser

Tag der mündlichen Prüfung: 18. März 2010

Für Opa

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1. Fragestellung	9
1.2. Das humane Immunsystem	11
1.2.1. Die zwei Komponenten des menschlichen Immunsystems	11
1.2.2. Erkennungsstrategien angeborener und adaptiver Immunität	12
1.2.3. <i>Pattern-recognition</i> -Rezeptoren als Teil angeborener Erkennung	13
1.2.3.1. Die Familie der Toll-Rezeptoren	13
1.2.3.2. Die humanen <i>Toll-like</i> -Rezeptoren und deren Liganden	14
1.2.3.3. Signaltransduktion durch <i>Toll-like</i> -Rezeptoren	16
1.2.3.4. <i>Retinoic acid inducible gene I</i> (RIG-I)	18
1.2.3.5. Bedeutung von RIG-I in der antiviralen Immunantwort	19
1.2.4. Interferone als Effektormechanismen angeborener Immunität	20
1.2.4.1. Entdeckung, Einteilung und Funktion	20
1.2.4.2. Klinischer Einsatz von Interferonen	20
1.2.4.3. Zelluläre Produzenten von Typ I-Interferon	21
1.2.4.4. Typ I-Interferon-Induktionsmechanismen	21
1.3. <i>Small interfering RNA</i>	23
1.3.1. Entdeckung, Entstehung und Wirkmechanismen	23
1.3.2. Wirkungen von <i>small interfering RNA</i>	24
1.3.3. Klinische Anwendung und Bedeutung	25
2. Material und Methoden	26
2.1. Geräte, Chemikalien und Reagenzien	26
2.1.1. Geräte	26
2.1.2. Chemikalien	27
2.1.3. Reagenziensätze	27
2.1.4. Materialien für die Zellkultur	27
2.1.5. Zytokine, Wachstumsstimulatoren und Stimulanzen	28
2.1.6. Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen	28
2.1.7. Antikörper	29
2.1.8. Plasmide	30

2.1.9.	Material für RNA-Oligonukleotidsynthese und Aufreinigung	30
2.1.10.	Chemisch synthetisierte RNA	31
2.1.11.	Oligodesoxynukleotide	31
2.2.	Zellen	32
2.2.1.	Humane Zelllinie	32
2.2.2.	Murine Zellen	32
2.3.	Zellulär-immunologische Methoden	33
2.3.1.	Zellkultur	33
2.3.1.1.	Allgemeine Kulturbedingungen	33
2.3.1.2.	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	33
2.3.1.3.	Kultivierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes	33
2.3.1.4.	Kultivierung von HEK-293-Zellen	33
2.3.1.5.	Kultivierung muriner Knochenmarkzellen	34
2.3.2.	Durchflusszytometrie	34
2.3.2.1.	Allgemeines Funktionsprinzip	34
2.3.2.2.	Bestimmung von Oberflächenmolekülen	35
2.3.3.	Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes	36
2.3.3.1.	Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation	36
2.3.3.2.	Aufreinigung mittels magnetischer Zellsortierung	37
2.3.4.	Zellstimulation	38
2.3.5.	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	38
2.3.5.1.	Die kompetitive Form	38
2.3.5.2.	Das Sandwich-Prinzip	39
2.4.	Molekularbiologische Methoden	40
2.4.1.	Reporterassays	40
2.4.1.1.	Transfektion mit Poly-Ethylen-Imin	40
2.4.1.2.	Interferon- β -Messung im Luciferase-Assay	40
2.4.1.3.	β -Galacton-Assay	41
2.4.2.	In vitro-Synthese von RNA	41
2.4.3.	Gelelektrophorese	42
2.4.4.	Konzentrationsbestimmung von RNA-Oligonukleotiden	42
2.5.	Statistische Analyse	43

3. Ergebnisse	44
3.1. Charakterisierung der Interferon-Induktion	44
3.1.1. Triphosphat-abhängige Interferon-Induktion	44
3.1.2. <i>Toll-like</i> -Rezeptor-unabhängige Interferon-Antwort.....	45
3.1.2.1. Interferon-Induktion durch Triphosphat-RNA bei <i>TLR7-Knockout</i> - .. Maus entspricht der Interferon-Induktion bei <i>TLR7-Wildtyp</i>	45
3.1.2.2. Unabhängigkeit von endosomaler Reifung	46
3.2. Identifizierung zellulärer Hauptproduzenten von Typ-I-Interferon.....	
im peripheren Blut	47
3.2.1. PDC-unabhängige Interferon-Induktion.....	47
3.2.2. Monozyten als Hauptproduzenten im peripheren Blut.....	47
3.3. Charakterisierung der immunmodulatorischen <i>small interfering</i> RNA	48
3.3.1. Einzel- und doppelsträngige sowie <i>sense</i> - und <i>antisense</i>	
Triphosphat-RNA als Immunstimulans.....	48
3.3.2. Unabhängigkeit der Interferon-Induktion von der 3`-Sequenz	49
3.3.3. Längenabhängigkeit der Immunstimulation durch Triphosphat-RNA.....	50
3.3.4. Aufhebung der Interferon-Induktion durch Triphosphat-RNA- <i>Capping</i> ..	51
3.4. Bedeutung der RNA-Helikase RIG-I	52
3.4.1. RIG-I-abhängige Triphosphat-RNA-vermittelte Interferon-Induktion	52
3.4.2. RIG-I-vermittelte Interferon-Induktion durch exogene und endogene	
Triphosphat-RNA	53
4. Diskussion	55
4.1. Übersicht über die experimentellen Ergebnisse.....	55
4.2. Ergebnisinterpretation im Vergleich mit der Literatur	56
4.2.1. Charakterisierung des Liganden	56
4.2.1.1. Strukturabhängigkeit.....	56
4.2.1.2. Sequenzabhängigkeit	57
4.2.1.3. Längenabhängigkeit	58

4.2.2.	Charakterisierung zur Interferon-Induktion führenden Mechanismen	59
4.2.2.1.	Bedeutung von <i>Toll-like</i> -Rezeptoren.....	59
4.2.2.2.	Einfluss endosomaler Reifung	60
4.2.2.3.	Bedeutung von RIG-I	61
4.2.2.4.	Einfluss von <i>Capping</i> der Triphosphat-RNA.....	62
4.2.3.	Hauptproduzenten im peripheren Blut	65
4.3.	Klinische Bedeutung.....	66
 5. ZUSAMMENFASSUNG		67
5.1.	Ergebnisse	67
5.2.	Bedeutung und Ausblick.....	69
 6. Literaturverzeichnis		70
7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme		76
8. Danksagung		78
9. Veröffentlichung		79
10. Lebenslauf		80

1. Einleitung

1.1. Fragestellung

Seit langem ist bekannt, dass Nukleinsäuren den menschlichen Organismus in einen antiviralen Status versetzen können. Dabei kennt man verschiedene im Zytoplasma ablaufende Mechanismen, die durch die Erkennung von Nukleinsäuren zur Interferon-Induktion führen; auch an das Endosom gebundene Erkennung von Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA) über das *Toll-like*-Rezeptor-System ist beschrieben (Alexopoulou et al. 2001; Diebold et al. 2004; Heil et al. 2004; Hemmi et al. 2000).

Die Arbeitsgruppe um Kim beobachtete erstmals einen Interferon-induzierenden Effekt kurzer RNA-Oligonukleotide, die am 5'-Ende ein freies Triphosphat tragen (Kim et al. 2004). Über die Wirkungsweise dieser im Experiment immunmodulatorisch sehr wirksamen Struktur war bislang wenig bekannt, insbesondere lässt sie sich in keines der bekannten Schemen einordnen. Interessanter Weise kommt es bei viraler Replikation zu einer Akkumulation ebenfalls Triphosphat-modifizierter RNA-Transkripte des Erregers. Allerdings tragen diese Nukleinsäuren eine „maskierende“ *Cap*-Struktur am 5'-Ende (Honda et al. 1998). Die Beobachtungen von Kim et al. – Interferon-Induktion durch RNA-Oligonukleotide mit einem Triphosphat-Ende – könnten also durchaus im Sinne einer Fremderkennung von Bedeutung sein.

Es erscheint lohnenswert, diesen Ligandentyp, der etwa mit einem noch unbekannten Erkennungsmechanismus von in den Organismus eingedrungenen Viren in Verbindung gebracht werden könnte, in seinen Eigenschaften möglichst genau zu erfassen. Dies ist nicht nur für den naturwissenschaftlichen Erkenntnisgewinn bedeutsam, sondern auch für eine immuntherapeutische Anwendung entscheidend. Vor diesem Hintergrund sollen sowohl Struktur, Längen- und Motivabhängigkeit der beschriebenen Triphosphat-RNA möglichst genau charakterisiert als auch Fragen nach den Vorgängen, die zur Interferon-Induktion führen, geklärt werden. Konkret soll diese Dissertation folgende Fragestellungen beantworten:

- (1) Welche strukturellen Voraussetzungen der Triphosphat-RNA-Oligonukleotide sind immunstimulatorisch besonders potent und günstig?
- (2) Welche Rolle spielt das *Toll-like*-Rezeptor-System bei der Detektion von Triphosphat-RNA-Oligonukleotiden?
- (3) Welche Immunzellpopulationen könnten therapeutisch beeinflusst werden?

(4) Welche weiteren Mechanismen stehen hinter der beobachteten Interferon-Induktion?

Die folgenden Abschnitte sollen einen Einblick in die für das Verständnis der Arbeit wichtigsten Themenbereiche geben: Ausgehend von einer Einführung in das menschliche Immunsystem werden die aus der Arbeit von Kim et al. resultierenden Eckpunkte dargestellt: So wird einerseits auf Interferon als messbares Ergebnis der Immunstimulation eingegangen. Aufzuklären ist der Weg zum Interferon; bekannte Signalwege im Zusammenhang mit RNA und Interferon-Induktion werden deshalb als Ausgangspunkte für die Ergründung des offenen Mechanismus näher beleuchtet. Zuletzt werden zur immunmodulatorischen RNA, einer so genannten *small interfering* RNA, die am Anfang der Interferon-Induktion steht, relevante Informationen gegeben. Das einführende Kapitel vollzieht so gleichzeitig das gedankliche Herantasten an die Lösung des untersuchten, von Kim et al. beschriebenen Mechanismus nach: Interferon-Induktion durch Triphosphat-RNA.

1.2. Das humane Immunsystem

Jeder Mensch ist in seiner Unversehrtheit ständig durch Umwelteinflüsse oder eigene pathologisch wirkende Strukturen bedroht. Die Integrität des Organismus dennoch aufrecht zu erhalten, ist eine wichtige Aufgabe der Zellen und Mechanismen, die unter dem Begriff Immunsystem zusammengefasst werden. Dabei ist die Unterscheidung von „Selbst“, das heißt körpereigenen Strukturen und „Fremd“, also in den Körper eingedrungenen Substanzen oder Erregern, aber auch pathologisch veränderten eigenen Tumor- oder Virus-infizierten Zellen, eine essenzielle Voraussetzung.

1.2.1. Die zwei Komponenten des menschlichen Immunsystems

Traditionell wird das Immunsystem in zwei Komponenten eingeteilt, in die angeborene und die adaptive Immunität.

Das adaptive Immunsystem umfasst zwei Klassen von Zellen, die B- und T-Lymphozyten. Das Repertoire der Antigenerkennungsmechanismen dieser Zellpopulationen ist sehr groß: Durch den Prozess der somatischen Rekombination wird jeder Lymphozyt mit einem strukturell einzigartigen Antigenrezeptor ausgestattet. Der Umfang und auch die Mannigfaltigkeit des dadurch entstehenden Rezeptor-Angebots bietet für viele Antigene einen „passenden“ Lymphozyten, der auf Erkennung seiner Schlüsselstruktur mit Aktivierung, Proliferation und entsprechender Effektorfunktion antwortet. Dieser Prozess der Vermehrung und Differenzierung eines Lymphozyten nach seiner spezifischen Antigenerkennung, der klonale Selektion genannt wird, stellt das Herzstück der adaptiven Immunabwehr dar. Eine klonale Expansion der Lymphozyten nach Antigenstimulation ist beispielsweise im Rahmen einer viralen Infektion notwendig, um eine effiziente Immunantwort zu generieren. Es dauert jedoch drei bis fünf Tage, bis eine ausreichende Zahl an klonal expandierten Lymphozyten gebildet ist und diese in Effektorzellen umgewandelt sind. An dieser Stelle kommt das angeborene Immunsystem ins Spiel: Da es in der Lage ist, bereits in der frühen Phase einer Infektion Erreger zu erkennen und effektiv zu bekämpfen, kann es diese zeitliche Lücke schließen. Durch die Mechanismen der angeborenen Immunität wie Phagozytose, Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Antigenpräsentation wird zudem die Aktivierung der adaptiven Immunität eingeleitet und dabei die spezifische Immunantwort an die Abwehrsituation angepasst. Die beiden

Komponenten sind somit als Bestandteile eines abgestimmten Abwehr-Mechanismus zu verstehen, in dem die angeborene Immunität Sensor- und Aktivatorfunktion für die folgende spezifische Immunantwort übernimmt (zur Übersicht siehe Janeway et al. 2002).

1.2.2. Erkennungsstrategien angeborener und adaptiver Immunität

Ein Hauptunterschied zwischen angeborener und adaptiver Immunität sind die Mechanismen zur Unterscheidung von Fremd und Selbst. Das adaptive Immunsystem bedient sich der T- und B-Zell-Rezeptoren, die während der Lymphozytenreifung durch somatische Rekombination der Rezeptor-kodierenden Gene so angelegt werden, dass jeder Lymphozyt letztlich mit einem strukturell einzigartigen Rezeptor ausgestattet ist. Da diese Rezeptoren nicht in der Keimbahn kodiert werden, ist der einzelne Rezeptor zunächst nicht für ein bestimmtes Antigen festgelegt. Es entsteht hingegen ein – im Rahmen des verfügbaren Genmaterials - zufälliges Rezeptorrepertoire, aus dem im Laufe des Lebens lediglich die „nützlichen“, ihr spezifisches Antigen erkennenden Rezeptoren durch positive und negative Selektionsmechanismen ausgewählt werden und die dazugehörigen Lymphozyten klonal expandieren.

Im Verlauf der Evolution hat sich die angeborene Immunität lange vor der adaptiven ausgebildet. So verfügt jedes mehrzellige Lebewesen über eine Form von angeborener Immunabwehr. Im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem werden die Erkennungsmechanismen der angeborenen Immunität durch Keimbahn-kodierte Rezeptoren vermittelt. Die Spezifität eines jeden Rezeptors ist daher genetisch festgelegt. Von Vorteil ist, dass diese Strukturen, die sich unter dem Selektionsdruck der Evolution zu Mikroorganismen-spezifischen Rezeptoren entwickelt haben, von Generation zu Generation weitergegeben werden können. Nachteilig ist allerdings, dass jedes Genom in Größe und folglich der Anzahl kodierender Gene limitiert ist.

Als Antwort auf das Ungleichgewicht zwischen der großen Zahl vielfältiger und einem ständigen Selektionsdruck unterliegenden Mikroorganismen auf der einen Seite und der begrenzten Kapazität an angeborenen Erkennungsstrukturen auf der anderen Seite, haben sich die so genannten *Pattern-recognition*-Rezeptoren (PRR) entwickelt. Diese Rezeptoren erkennen Strukturen, die vielen Mikroorganismen gemeinsam sind, die so genannten *Pathogen-associated molecular pattern* (PAMP). Diese molekularen Erkennungsmuster stellen zwar strukturell eine sehr heterogene Gruppe dar, teilen jedoch einige gemeinsame Eigenschaften:

- (1) PAMP sind pathogenspezifisch und kommen im Wirtsorganismus nicht vor.
- (2) Die durch das angeborene Immunsystem erkannten Strukturen sind essenziell für das Überleben des Pathogens und können daher trotz Selektionsdruck durch den Wirt nicht mutieren.
- (3) Die erkannten Strukturen kommen in der Regel bei einer großen Klasse von pathogenen Keimen vor.

1.2.3. Pattern-recognition-Rezeptoren als Teil angeborener Erkennung

Antigenrezeptoren angeborener und erworbener Immunität differieren in mehreren entscheidenden Punkten. Die angeborenen PRR werden von vielen verschiedenen Effektorzellen exprimiert, insbesondere Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen (DC) oder B-Zellen. Das Expressionsmuster ist nicht wie bei den B- und T-Zell-Rezeptoren klonal verteilt, sondern alle Zellen einer bestimmten Subpopulation exprimieren Rezeptoren identischer Spezifität. Solche Rezeptoren können nach ihrer Stimulation, im Gegensatz zur verzögerten Antwort der adaptiven Immunzelle, eine unmittelbare Reaktion induzieren (Janeway et al. 2002). Jüngste Studien beschreiben als wichtigste Vertreter der PRR *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) (Barton et al. 2002), *Nucleotid-oligomerization domain* (NOD)-like-Rezeptoren (NLR), *C-type lectin-Rezeptoren* (CLR) sowie *Retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I)-like Helikasen (RLH); die letzt genannte Gruppe wird wiederum von den sich in ihren Helikasedomänen sehr ähnlichen *Melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA-5), *Laboratory of genetics and physiology 2* (LGP-2) und *Retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I) gebildet, welches im Abschnitt 1.2.3.4. im Detail vorgestellt wird. All diese Rezeptoren könnten als erkennende Struktur am Anfang einer Immunantwort stehen, wie sie von Kim et al. 2004 beschrieben wurde.

1.2.3.1. Die Familie der Toll-Rezeptoren

Die bekannteste Gruppe von PRR, die angeborene Immunität mit Hilfe von Signaltransduktionskaskaden vermittelt, ist die Familie der *Toll-like-Rezeptoren*. Bereits 1992 forderte Charles Janeway ihre Existenz als Herzstück angeborener Immunität (Janeway 1992). Dabei schrieb er ihnen neben der Initiation der raschen Komponente der Immunantwort auch eine entscheidende Rolle in der Induktion der adaptiven Abwehr zu.

Das Toll-Protein wurde in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt (Anderson et al. 1984), wo es an der Embryonalentwicklung beteiligt ist. Die Aufklärung von Struktur und Rolle des Toll-Rezeptors in der angeborenen Immunität der *Drosophila* (Lemaitre et al. 1996; Williams et al. 1997) sowie die Identifikation eines Toll-Rezeptor-Homologs im Zusammenhang mit Lipopolysaccharid (LPS)-Sensitivität (Poltorak et al. 1998; Qureshi et al. 1999) war eine erste experimentelle Bestätigung der von Janeway postulierten Erkennungsmechanismen. Durch Zufall wurde eine bedeutende Rolle dieses Rezeptors in der Abwehr von Pilzinfektionen bei *Drosophila* entdeckt (Lemaitre et al. 1996). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ein Toll-verwandtes Protein namens *18-wheeler* eine bedeutende Funktion in der anti-bakteriellen Abwehr der Fruchtfliege einnimmt (Williams et al. 1997). Bei der Durchsicht humaner Gendatenbanken wurde kurz darauf eine dem *Drosophila*-Toll-Gen verwandte Sequenz im menschlichen Genom identifiziert, die später humaner TLR1 getauft wurde (Nomura et al. 1994; Taguchi et al. 1996). Auf der Suche nach Erkennungsstrukturen des angeborenen, humanen Immunsystems identifizierten Janeway und Mitarbeiter das erste zum *Drosophila*-Toll strukturallogische Protein beim Menschen – hTLR4 (Medzhitov et al. 1997). Erste funktionelle Untersuchungen bestätigten die Bedeutung dieser Proteinklasse auch für das angeborene Immunsystem des Menschen. So führte die Überexpression dieses Proteins in Abhängigkeit vom Transkriptionsfaktor *Nuklear factor kappa B* (NF- κ B) zur Produktion von proinflammatorischen Mediatoren. Ferner wurde auch die postulierte Rolle in der Induktion einer adaptiven Immunität bekräftigt, da Zelllinien, die dieses Gen stark exprimierten, zur Aktivierung von naiven T-Zellen führten.

Den eindeutigen Beweis, der TLR4 als einen PRR des angeborenen Immunsystems klassifizierte, brachte die Beobachtung, dass TLR4 zum LPS-Signalkomplex in der Maus gehört. Poltorak et al. konnten zeigen, dass Mäuse mit Mutation im TLR4-Gen nicht auf LPS-Stimulation reagierten und eine sonst tödliche Endotoxin-Gabe schadlos überstanden (Poltorak et al. 1998). Diese Beobachtung wurde später an TLR4-*Knockout*-Mäusen durch andere Arbeitsgruppen bestätigt (Qureshi et al. 1999).

1.2.3.2. Die humanen Toll-like-Rezeptoren und deren Liganden

Inzwischen sind 10 humane *Toll-like*-Rezeptoren beschrieben (Rock et al. 1998; Takeuchi et al. 1999; Du et al. 2000; Hemmi et al. 2000; Chuang et al. 2001; Akira et al. 2006). Während das Protein in der *Drosophila* über proteolytische Kaskaden aktiviert wird (Lemaitre 2004), geschieht dies im humanen System direkt über Fremdstrukturen (Bauer et al. 2002; Beutler et al. 2003). Heute kennt man eine Reihe

spezifischer Liganden, meist mikrobiellen Ursprungs. Die Lokalisation einzelner TLR korreliert gewissermaßen mit den molekularen Ligandenstrukturen: Während TLR1, 2, 4 und 5 auf der Zelloberfläche zu finden sind, sind TLR3, 7 und 9 in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert (siehe Abbildung 1), ebenso TLR8, TLR3 zusätzlich in der Zellmembran. TLR3, 7, 8 und 9 sind an der Erkennung mikrobieller Nukleinsäuren beteiligt: TLR3 detektiert doppelsträngige RNA, während TLR7 und 8 einzelsträngige RNA erkennen, TLR9 bindet unmethylierte DNA mit CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanosin) -Motiven. Nachdem TLR transmembrane Proteine sind, können sie keine viralen Komponenten im Zytoplasma einer Zelle erkennen.

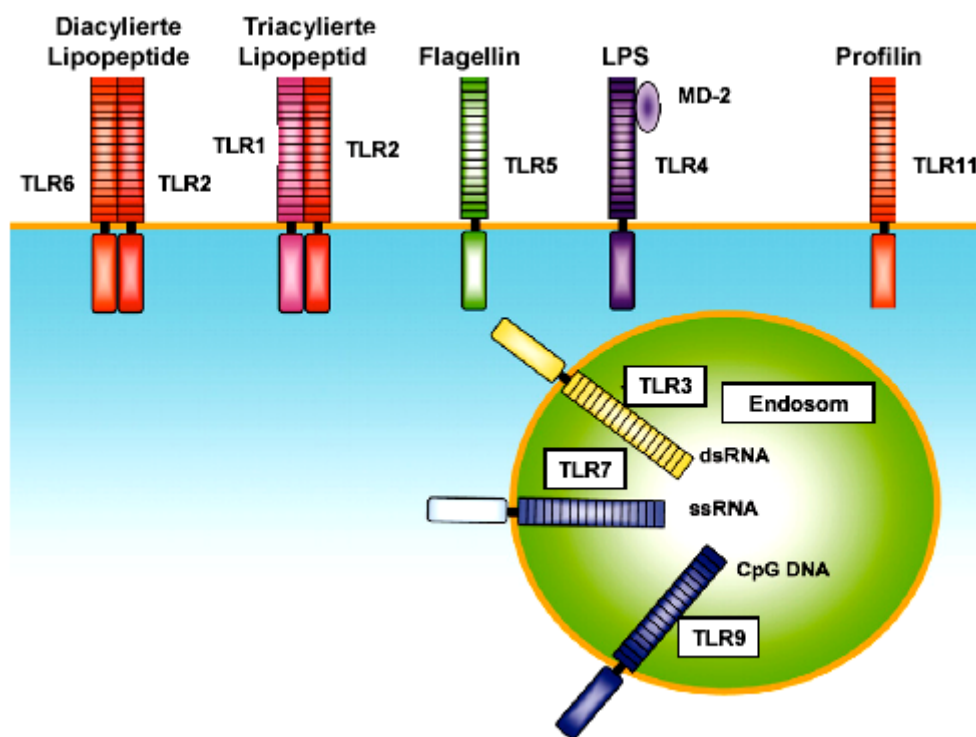


Abbildung 1: **TLR und ihre Liganden** (nach Takeda et al. 2005)

TLR2 ist essentiell für die Erkennung mikrobieller Lipopeptide und kooperiert mit **TLR1** und **6**; so können diacylierte und triacylierte Lipopeptide unterschieden werden. **TLR4** erkennt mit *Myeloid differentiation-2* (MD-2) LPS und **TLR5** kann Flagellin detektieren. Endosomal erkennt **TLR3** virale doppelsträngige RNA, während einzelsträngige RNA **TLR7** und **8** aktiviert. **TLR9** ist Sensor für CpG-DNA.

1.2.3.3. Signaltransduktion durch Toll-like-Rezeptoren

Das TLR-System ist also in der Lage, ein breites Spektrum verschiedener Antigene zu erkennen. Durch deren Stimulation kommt es über die Induktion verschiedener Transkriptionsfaktoren zur Produktion von Mediatoren angeborener Immunität. Dazu zählen Signalstoffe wie Interferon, die den Organismus in einen antiviralen Status versetzen können. Außerdem werden TLR-vermittelt kostimulatorische Moleküle exprimiert, die für die Induktion der adaptiven Immunantwort grundlegend sind.

Da es also zwischen der von Kim et al. beschriebenen und TLR-vermittelter Immunstimulation Übereinstimmungen gibt – in beiden Fällen kann Nukleinsäure zur Interferon-Induktion führen – sollen im Folgenden TLR-abhängige bekannte Signalwege genauer dargestellt werden, um dann eine TLR-Beteiligung prüfen zu können. Der erste beschriebene TLR-Signalweg ist abhängig von dem Adaptermolekül *Myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88). Über seine so genannte TIR-Domäne - die zytoplasmatische Region, die entscheidend für die Signaltransduktion des jeweiligen TLR-Proteins ist - assoziiert es mit verschiedenen TLR und induziert stereotyp eine „inflammatorische Basisantwort“, vor allem über den *Nuclear factor kappa B* (NF κ B). Dazu bindet die N-terminale *Death domain* (DD) an die DD von Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) *associated kinase 4* (IRAK-4) (Janssens et al. 2002). IRAK-1 wird unabhängig von MyD88 rekrutiert und durch IRAK-4 phosphoryliert (Takeda et al. 2005). Die Kinasen dissoziieren dann von dem Rezeptorkomplex ab und interagieren mit dem *Tumor necrosis factor* (TNF) *receptor-associated factor 6* (TRAF-6) (Arch et al. 1998). TRAF-6 unterstützt anschließend die Aktivierung von *TGF β activated kinase-1* (TAK-1), I κ B-Kinasen und dadurch des Transkriptionsfaktors NF κ B (siehe Abbildung 2). Dieser reguliert die Expression vieler für Entzündung und Immunantwort wichtiger Gene. So enthalten verschiedene Zytokin-Promotoren Erkennungssequenzen für diesen Transkriptionsfaktor (Ghosh et al. 1998, Karin et al. 2000). Verschiedene TLR können dabei eine unterschiedliche Genexpression im gleichen Zelltyp induzieren. Auch zeigten Studien an MyD88-defizienten Mäusen, dass die TLR-vermittelte Zytokinproduktion zwar aufgehoben ist, es aber dennoch zu einer LPS-abhängigen Induktion von Interferon-induzierbaren Genen kommt (Kaisho et al. 2001; Kawai et al. 1999; Kawai et al. 2001). Auch die TLR3-vermittelte Signaltransduktion scheint MyD88-unabhängig zu sein (Alexopoulou et al. 2001). Die Arbeitsgruppe um Yamamoto beschrieb 2002 das Adapterprotein *TIR domain-containing adapter inducing IFN- β* (TRIF) (Yamamoto et al. 2002). Es induziert MyD88-unabhängig über den Transkriptionsfaktor *IFN regulatory factor 3* (IRF-3) die Transkription von Interferon; IRF-3 - Viren und virale doppelsträngige RNA zählen zu seinen potenten Aktivatoren - scheint als INF- β -Induktor eine Schlüsselrolle in der

Aktivierung von TLR3 und TLR4 zu spielen (Oshiumi et al. 2003a; Yamamoto et al. 2002) (Abbildung 2).

Wegen der schlechten TRIF-TLR4-Interaktion wurde ein weiterer Adapter gesucht. So publizierten 2003 zwei Gruppen das für TLR4-vermittelte, MyD88-unabhängige Signaltransduktion spezifische *TRIF related adapter molecule* (TRAM) (Oshiumi et al. 2003b; Yamamoto et al. 2003). TRAM wird von keinem anderen TLR benutzt.

In weiteren Experimenten an MyD88-defizienten Mäusen konnte nur durch den TLR4-Agonisten LPS der Transkriptionsfaktor NF κ B induziert werden, allerdings verspätet im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Die MyD88-unabhängige Signaltransduktion ist also für die Aktivierung von IRF-3 und spät aktiviertes NF- κ B verantwortlich. Dieser bis jetzt nur dem TLR4 zugeordnete Signalweg wird durch eine Interaktion von TRIF mit TRAF-6 ausgelöst; unterhalb von TRAF-6 scheinen die Mechanismen ähnlich der MyD88-abhängigen Kaskade (siehe Abbildung 2) (Akira et al. 2003).

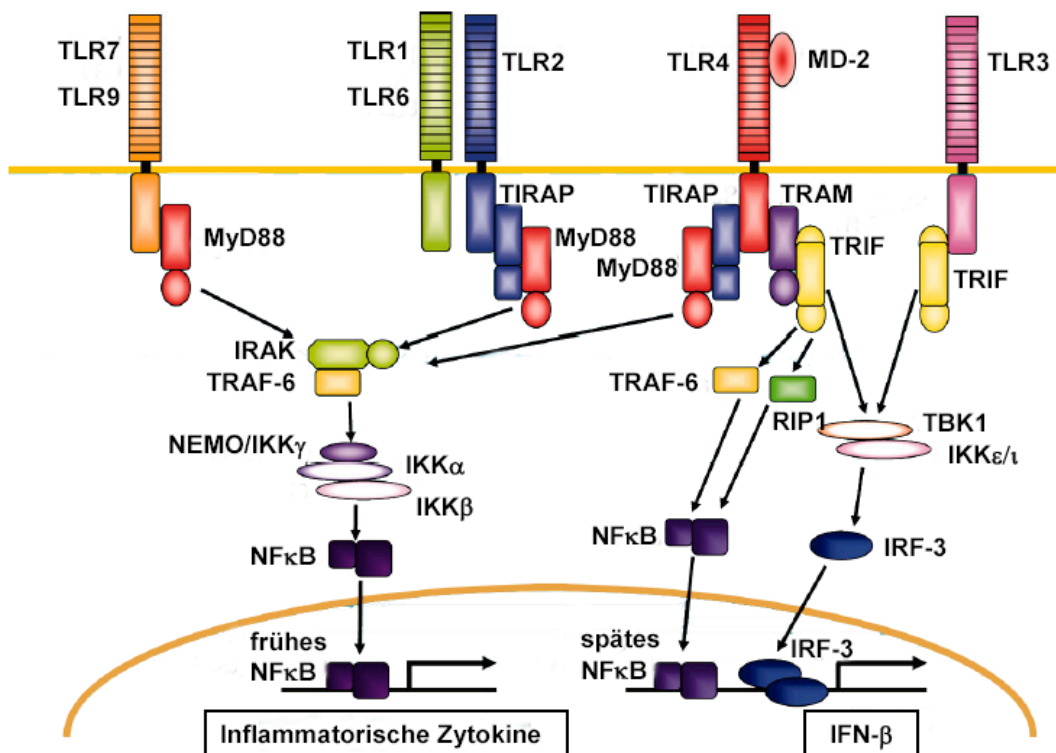


Abbildung 2: **TLR-abhängige Signaltransduktion** (nach Takeda et al. 2005)

Die TIR-Domäne ist Ausgangspunkt der Signaltransduktion über TLR. Das Adaptermolekül MyD88 assoziiert und rekrutiert IRAK zum Rezeptorkomplex. IRAK aktiviert TRAF-6 und dies wiederum den I κ B-Kinasen-Komplex. Letzterer phosphoryliert I κ B, es kommt zu einer Translokation von NF κ B und zur Induktion proinflammatorischer Proteine. Das TIR-Domänen-Adapterprotein (*TIR domain containing adapter protein*, TIRAP) spielt eine Rolle in der MyD88-abhängigen Signaltransduktion über TLR2 und TLR4. Via TLR3 und TLR4 kommt es über die MyD88-unabhängige Aktivierung von IRF-3 zur Induktion IFN- β -abhängiger Gene. TRIF ist essentiell für die MyD88-unabhängige Signaltransduktion. Untypische I κ B-Kinasen aktivieren IRF-3 unterhalb von TRIF. TRAM ist nur an der MyD88-unabhängigen bzw. TRIF-abhängigen Signaltransduktion über TLR4 beteiligt.

1.2.3.4. *Retinoic acid inducible gene I*

Bisher wurden *Toll-like*-Rezeptoren - zum Zeitpunkt der Arbeit sicherlich erste Assoziation auf der Suche nach einem Adapter, der kurze RNA erkennen und Interferon-Induktion vermitteln kann - eingeführt. Im Folgenden soll es um *Retinoic acid inducible gene I* (RIG-I) als interessanten zytosolischen RNA-Sensor gehen.

RIG-I, das als Kandidat für zytoplasmatische virale RNA-Detektion identifiziert wurde, gehört zu den DexD/H-box-RNA-Helikasen (Yoneyama et al. 2004). RIG-I besteht aus zwei N-terminalen Caspase-Recruitment-Domänen (CARD) und einer C-terminalen DExD/H box-RNA-Helikase-Domäne (siehe Abbildung 4A). Experimentell wurden zwei RIG-I-Mutanten eingesetzt: RIG-I K270A hat eine Punktmutation und RIG-IC besitzt keine CARD-Domäne (Abbildung 4B).

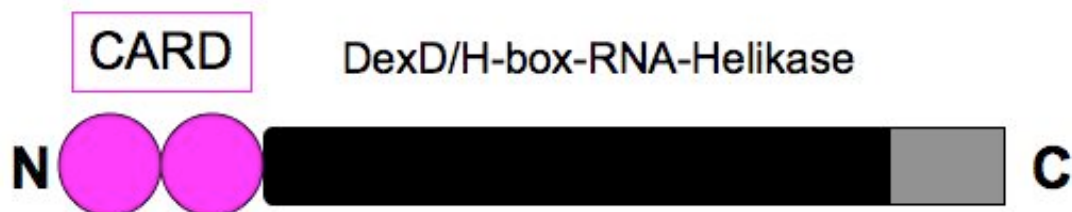


Abbildung 4A: **Retinoic acid inducible gene I (RIG-I)**

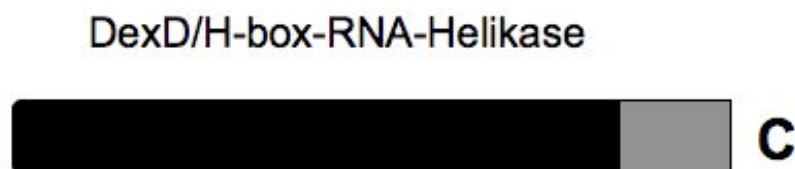


Abbildung 4B: **Retinoic acid inducible gene I ohne CARD-Domäne (RIG-IC)**

Entdeckt wurde RIG-I ursprünglich in Zellen bei Promyelozytenleukämie nach Therapie mit All-trans-Retinsäure (Sun 1997). Die Identifikation eines RIG-I-homologen Gens bei Schweinen ergab erste Hinweise auf dessen Bedeutung im Zusammenhang mit viralen Infektionen (Zhang et al. 2000). 2004 beschrieben Yoneyama et al. die zentrale Rolle dieser RNA-Helikase bei der Induktion einer antiviralen Antwort durch doppelsträngige RNA.

1.2.3.5. Bedeutung von RIG-I in der antiviralen Immunantwort

Neben den TLR gelten RIG-I-ähnliche Helikasen aktuell als das zweite wichtige Rezeptorsystem um RNA-Viren zu erkennen. Es spielt eine zentrale Rolle in einer Reihe von Zelltypen mit Ausnahme der plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC), die sich der oben eingeführten TLR zur viralen Erkennung bedienen. So sind RIG-I-ähnliche Helikasen (RLH) etwa in Leberzellen, Fibroblasten oder konventionellen dendritischen Zellen essentiell zur Typ-I-Interferon-Produktion. Die Expression von Genen, die RLH kodieren, wird wiederum stark durch Interferone induziert. Über ihre Helikase-Domäne interagieren RLH mit ihrem Liganden, etwa doppelsträngiger RNA; die N-terminalen CARD-Domänen spielen eine entscheidende Rolle in der Vermittlung von Signalwegen, die etwa zur Produktion von Typ-I-Interferon führen. In Folge einer RNA-Virusinfektion entsteht bei der Virusreplikation doppelsträngige RNA in infizierten Zellen.

Anfänglich wurden RIG-I wie auch *Melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA-5) als Detektoren von Poly I:C, einem synthetischen Analogon viraler doppelsträngiger RNA, gehandelt. Nach weiteren Experimenten in *Knockout*-Mäusen wurde postuliert, dass alleine MDA-5 Poly I:C erkennt (Gitlin et al. 2006, Kato et al. 2006), nur RIG-I hingegen 5'-Triphosphat-RNA detektiert (Hornung et al. 2006, Pichelmair et al. 2006). Dann ging man davon aus, dass RIG-I selektiv sowohl einzelsträngige Triphosphat-RNA als auch kurze doppelsträngige RNA als fremd erkennt, MDA-5 längere doppelsträngige RNA erkennt (Kato et al. 2008). Mit dieser „Aufgabenteilung“ konform werden verschiedene RNA-Viren entsprechend ihrer strukturellen Genomdifferenzen ebenfalls durch RIG-I oder MDA-5 erkannt. Die Bedeutung beider Proteine unterstreichen Versuche, die in RIG-I- bzw. MDA-5-*Knockout*-Mäusen eine hohe Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Viren zeigen konnten (Kato et al. 2006). Klarheit über die genaue RIG-I-Ligandenstruktur brachten jüngste Ergebnisse von Schlee et al. (Schlee et al. 2009): Durch den Einsatz definierter, vollständig chemisch hergestellter RNA-Moleküle bestätigten sie, dass ein 5'-Triphosphat für die maximale RIG-I-Aktivierung nötig ist, zeigten aber, dass zur Erkennung des 5'-Triphosphats zusätzlich ein Doppelstrang von mindestens 19 Nukleotiden Voraussetzung ist.

1.2.4. Interferone als Effektormechanismen angeborener Immunität

Ein möglicher Weg von RNA zu Interferon ist also die unter 1.2.3.3. beschriebene TLR-abhängige Signaltransduktion. Daneben können noch weitere Mechanismen etwa über RLH zu einer derartigen Immunantwort führen. Im Folgenden sollen – nach einer kurzen Einführung - ausgehend von Interferon als Äquivalent der Immunantwort alternative Rezeptoren und Abläufe dargestellt werden.

1.2.4.1. Entdeckung, Einteilung und Funktion

„Antivirale Effektormoleküle“ wurden vor gut 50 Jahren erstmals von Isaacs und Lindenmann beschrieben. Diese Proteine wurden dann „Interferone“ getauft, weil man erkannte, dass sie bei viraler Replikation in befallenen Zellen störend eingreifen (englisch „to interfere“). Man unterscheidet Interferon- α (INF- α) und - β (INF- β) - die man auch als Typ-I-Interferone zusammenfasst - von Interferon- γ , das nicht durch virale Infektion freigesetzt wird. INF- α - eine Gruppe mehrerer eng verwandter Proteine - sowie INF- β als Produkt eines einzelnen Gens werden in vielen verschiedenen Zelltypen nach Infektion mit einem Virus produziert; es handelt sich um Zytokine mit pleiotropen Effekten, die verschiedene Beiträge im „antiviralen Kampf“ leisten und deshalb essentiell für die gegen den Virus gerichtete Immunantwort sind. Durch die Expression von Genen, die die Zerstörung von *messenger* RNA (mRNA) verursachen und die Translation von viralen und Wirtsproteinen hemmen, schaffen Interferone in uninfizierten Zellen Resistenz gegenüber viraler Replikation. Weiter aktivieren sie natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die selektiv virusinfizierte Zellen töten, und unterstützen die Freisetzung von wichtigen Zytokinen. Außerdem führen Interferone zu einer erhöhten Expression von *Major histocompatibility complex* (MHC)-I-Rezeptoren; diese präsentieren dann vermehrt virale Peptide an CD8-positive T-Zellen und es kommt zu deren Aktivierung. Auf gesunde Zellen hat eine vermehrte MHC-I-Expression einen schützenden Effekt gegen falschen Angriff durch natürliche Killerzellen (Janeway et al. 2005).

1.2.4.2. Klinischer Einsatz von Interferonen

Wie bereits angedeutet, haben Interferone hohe klinische Relevanz. Sie wirken immunmodulatorisch, antiviral und antiproliferativ. Ein Grundgedanke ihres therapeutischen Einsatzes ist etwa, den Organismus in einen antiviralen Status zu versetzen bzw. die Bekämpfung einer Virusinfektion zu unterstützen. Inzwischen

werden Interferone gentechnisch hergestellt. Interferon- α gehört heute zur Basistherapie von Hepatitis C und findet auch bei der Behandlung von Hepatitis B Einsatz. Außerdem wurde der Einsatz von Interferon- α in den 1980ern intensiv zur Therapie von chronischer myeloischer Leukämie geprüft und war vor der Entwicklung von Tyrosinkinase-Inhibitoren für die meisten Patienten Therapie der Wahl, wenn eine Stammzelltransplantation keine therapeutische Option darstellte (Talpaz et al. 1983; Talpaz et al. 1986). Interferon- β ist Standard in der Intervalltherapie bei Multipler Sklerose. Allerdings sind grundlegende Mechanismen der IFN-Induktion nicht vollständig verstanden. Insofern verspricht die Untersuchung eines Signalwegs, an dessen Ende Interferon steht, nicht nur naturwissenschaftlichen Erkenntnisgewinn, sondern auch klinische Konsequenz.

1.2.4.3. Zelluläre Produzenten von Typ-I-Interferon

Als die so genannten klassischen Interferon-produzierenden Zellen gelten plasmazytoide dendritische Zellen (PDC), die als Antwort auf virale Infektionen große Mengen Typ-I-Interferon produzieren. Dabei laufen TLR-vermittelte Signalwege ab (siehe 1.2.3.3.); PDC exprimieren sowohl TLR7 als auch TLR9 in hohem Maße und können dem entsprechend durch virale RNA (TLR7-vermittelt) und DNA (TLR9-vermittelt) aktiviert werden. Allerdings weisen Studien darauf hin, dass auch viele andere Zelltypen Typ-I-Interferon freisetzen können und PDC möglicher Weise in den Vordergrund treten, wenn Makrophagen als erste Abwehrinstanz ausfallen (Kumagai et al. 2007).

1.2.4.4. Typ-I-Interferon-Induktionsmechanismen

Wie bereits erwähnt, wurde Interferon im Zusammenhang mit antiviralen Mechanismen beschrieben. Durch eine Virusinfektion wird als erstes das angeborene Immunsystem aktiviert und setzt durch die Produktion von Typ-I-Interferon eine antivirale Reaktion in Gang: Als Antwort auf virale Infektionen werden virale Komponenten wie RNA und DNA durch die bereits ausführlich behandelten TLR oder aber durch TLR-unabhängige Mechanismen erkannt und wirksam. Bei den TLR spielen TLR3, TLR7 und TLR8 in der RNA-Erkennung die zentrale Rolle (siehe 1.2.3.3.). Als Vertreter der zweiten, also TLR-unabhängigen Gruppe ist schon lange die Proteinkinase R (PKR) bekannt, jünger ist das Wissen über RIG-I-like helicases (RLH) wie RIG-I oder MDA-5. PKR galt lange als Hauptsensor langer, doppelsträngiger RNA und Adapter in der Induktion von Typ-I-Interferon. Erst die Beobachtung, dass lange doppelsträngige RNA in PKR-Knockout-Zellen nach wie vor Interferon induzieren kann (Chu et al. 1999), führte nach weiteren

Versuchen zu der These eines TLR3-vermittelten Prozesses (Alexopoulou et al 2001). Im Verlauf wurde dieser Signalweg wie folgt beschrieben: Erkennung doppelsträngiger RNA durch TLR3, Aktivierung der Kinase TBK1, die wiederum den Transkriptionsfaktor IRF-3 phosphoryliert, der letztendlich zur Interferon- β -Induktion führt (siehe auch 1.2.3.3.; Fitzgerald et al 2003; Sharma et al. 2003).

2004 zeigten Yoneyama et al., dass RIG-I durch doppelsträngige RNA aktiviert wird und über ein Adapterprotein, dass zeitgleich von verschiedenen Gruppen als IPS-1, Cardif, MAVS und VISA beschrieben wurde (Kawai et al. 2005; Meylan et al. 2005; Seth et al. 2005; Xu et al. 2005) die Kinase TBK1 aktiviert, die dann zur Transkription des Interferon- β -Gens führt. Abbildung 3 zeigt vereinfacht wichtige RNA-vermittelte Interferon-Induktionswege, die für das Verständnis dieser Arbeit – gewissermaßen als Ausgangspunkt unserer Überlegungen - wichtig sind.

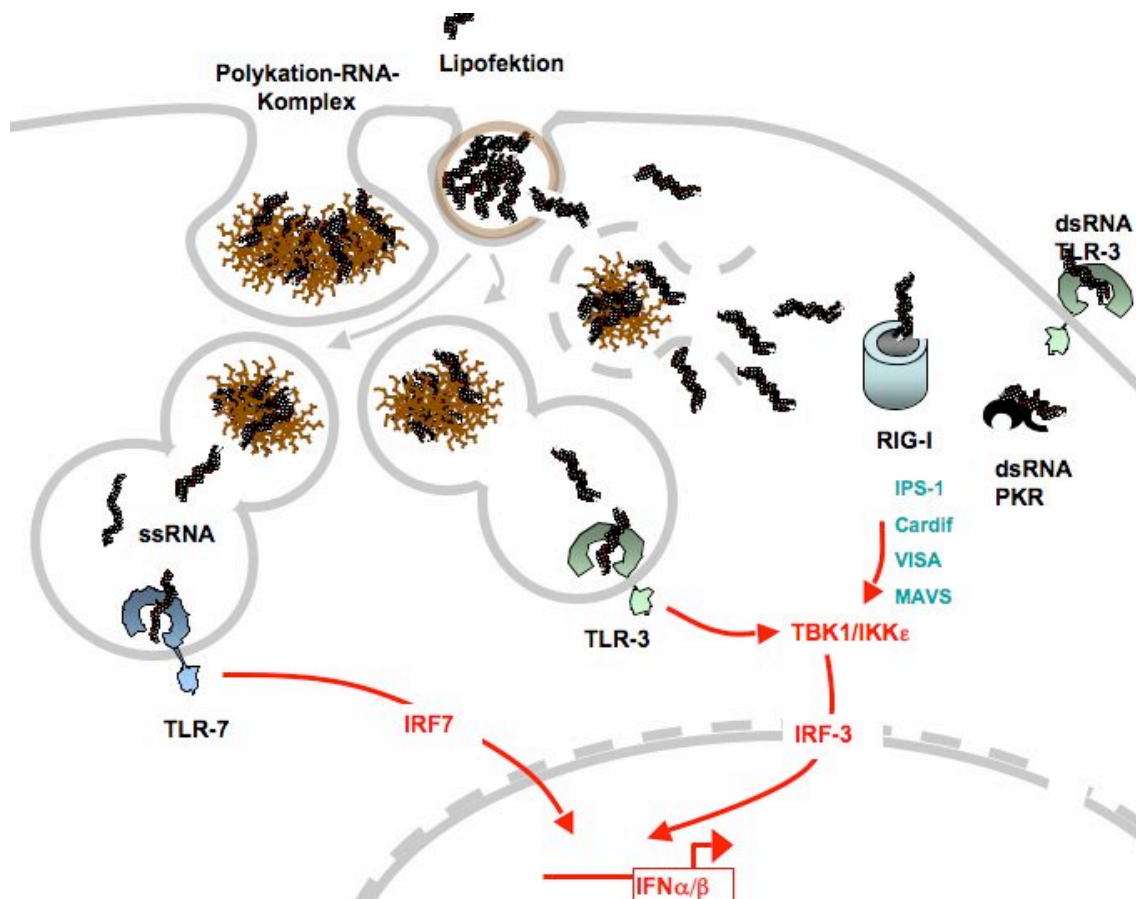


Abbildung 3: **Interferon-Induktion durch RNA** (nach Schlee 2005)

1.3. Small interfering RNA

1.3.1. Entdeckung, Entstehung und Wirkmechanismen

Zuletzt soll noch das „Ausgangsmolekül“ des von Kim et al. beschriebenen Effekts näher betrachtet werden: Es handelt sich um eine so genannte *small interfering* RNA (siRNA). Als solche bezeichnet man 21-28 Nukleotide lange RNA, Effektormolekül der so genannten RNA-Interferenz (RNAi). Der zugrunde liegende Mechanismus wurde 1998 von Fire und Mello in Versuchen an *Caenorhabditis elegans* entdeckt: Nach Injektion doppelsträngiger RNA beobachteten sie eine starke, sequenzabhängige Degradation zytoplasmatischer mRNA (Fire et al. 1998). In Folge dieser Erkenntnis wurde deutlich, dass posttranskriptionelles Gensilencing in Pflanzen und bei Pilzen nach ähnlichen Grundmechanismen ablaufen. RNAi hielt bald in der Erforschung von Genfunktionen Einzug und man weiß heute, dass dieser Mechanismus in beinahe allen Eukaryoten eine Rolle spielt.

Natürlich vorkommende siRNA entsteht aus der zytoplasmatischen Prozessierung langer doppelsträngiger RNA durch eine zytosolische Rnase III, die auch als Dicer bezeichnet wird. Dieses Enzym schneidet doppelsträngige RNA in etwa 21 Nukleotide lange siRNA; dann werden diese RNA-Oligonukleotide einzeln in einen Proteinkomplex mit dem Namen *RNA-induced silencing complex* (RISC) integriert. RISC wiederum schneidet mRNAs, die genau komplementäre Sequenzen enthalten; außerdem scheint RISC auch Translation zu behindern und Chromatin zu modifizieren (Dorsett et al. 2004). Neben der endogenen Produktion können derartige RNA-Oligonukleotide – etwa für experimentelle Settings - auch synthetisch hergestellt werden (siehe Material und Methoden).

1.3.2. Wirkungen von Small interfering RNA

Für das Verständnis dieser Arbeit ist die Kenntnis zweier grundlegend verschiedener Wirkungsweisen von siRNA entscheidend: Erstens des klassischen so genannten Gensilencing, eines zielgerichteten oder englisch *On-Target*-Effekts; und zweitens unspezifischer *Off-Target*-Effekte der kleinen RNA-Moleküle. Durch Gensilencing können – wie der Name schon vermuten lässt – gezielt Gene ausgeschaltet werden. Sehr anschaulich zeigt dies ein Versuch mit Zellen, die das *Green fluorescence protein* (GFP) exprimieren und deshalb unter dem Fluoreszenzmikroskop leuchten. Transfiziert man zusätzlich siRNA gegen GFP bleiben die Zellen schwarz (siehe Abbildung 5).

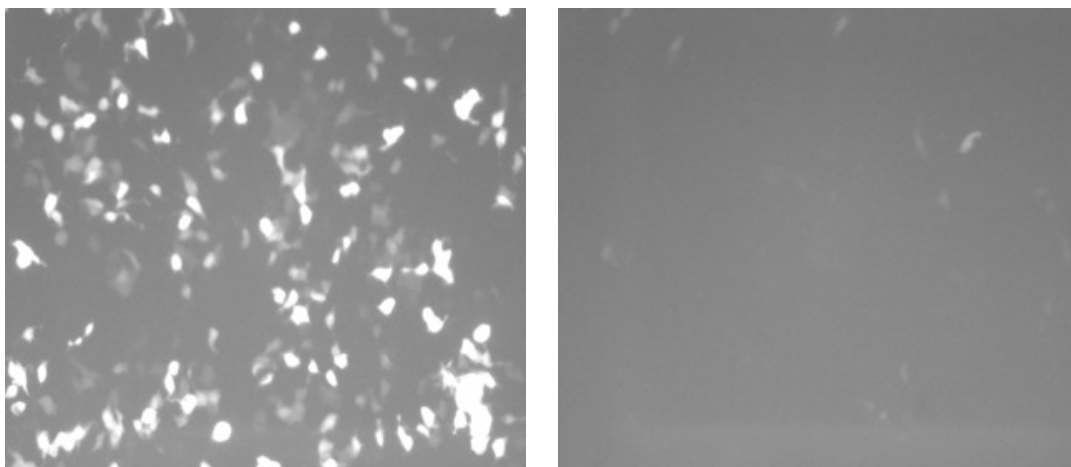


Abbildung 5: **Gen-Silencing – spezifischer Effekt**

Links: Zellen nach GFP-Transfektion; rechts: zusätzliche Transfektion von siRNA gegen GFP

Ein unspezifischer, also *Off-Target*-Effekt hat kein zielgerichtetes Silencing, sondern paradoxer Weise einen induktiven Effekt zur Folge: In diesem Fall werden die kurzen RNA-Moleküle durch das Immunsystem erkannt und führen etwa zur Induktion von Interferon- α . Bereits 2003 beschrieben Sledz et al. siRNA-vermittelte Interferon-Induktion, die der Proteinkinase R (PKR) zugeschrieben wurde; 2004 publizierten Kariko et al. eine TLR3-vermittelte Immunaktivierung durch siRNA, 2005 konnten Hornung et al. eine sequenzspezifische, TLR7-vermittelte IFN- α -Induktion in PDC beobachten. Den Anstoß für die vorliegende Arbeit lieferte das schon mehrfach genannte, 2004 erschienene Paper der Arbeitsgruppe Kim et al., in dem eine strukturabhängige Interferon-Induktion durch siRNA und durch einzelsträngige RNA nach Synthese durch eine Phagenpolymerase beschrieben wird.

1.3.3. Klinische Anwendung und Bedeutung

Auch an dieser Stelle soll nochmals auf die übergeordnete Bedeutung einer weiteren Versuchskonstaten eingegangen werden – auf die Rolle von *small interfering RNA*: Der Einsatz von synthetisch hergestellter siRNA in der Forschung bietet einen leistungsstarken Ansatz, um zielgerichtet verschiedene Gene auszuschalten (Gen-Silencing, Knockdown); so ergeben sich beispielsweise viel versprechende Möglichkeiten bei der Erforschung der physiologischen Bedeutung einzelner Gene, deren Genprodukte nach gezielter siRNA-Applikation verringert sind oder im Rahmen von „Gen-Netzwerk“-Analysen.

Der immuntherapeutische Einsatz, also die Nutzung des immunstimulatorischen unspezifischen Effekts, ist Bereich intensiver Forschung. Hier können Ergebnisse dieser Disseration durch die Untersuchung eines zentralen Immunmechanismus unter Einsatz einer immunmodulatorischen siRNA einfließen.

2. Material und Methoden

Zur Prüfung der immunstimulatorischen Aktivität verschiedener Triphosphat-RNA-Oligonukleotide wurden besonders zwei Systeme eingesetzt: Primäre Blutzellen aus gesunden menschlichen Spendern wurden nach den in 2.3.3. beschriebenen Methoden aufgereinigt und ihre Aktivierung mittels IFN- α ELISA gemessen. Außerdem wurden in HEK-293-Zellen mit IFN- β Promotor und Luciferase-Reporterplasmiden Versuche durchgeführt, deren Aktivierung über die Messung der Luciferase-Aktivität im Luminometer eine Aussage über die Interferon-Antwort zulässt.

2.1. Geräte, Chemikalien und Reagenzien

2.1.1. Geräte

Begasungsbrutschrank
Eismaschine
ELISA-Reader
FACSCalibur
FACStarplus
Gene Quant RNA/ DNA Calculator
Kamera Nikon F90X
Lamin Air (HB 244 8)
Light Cycler
Microplate Luminometer (Lumistar)
MidiMACS
Mikroskop (Axiovert 25)
MiniMACS
Omnifuge 2 ORS
pH-Meter
Photokammer
Power Pac 200 Spannungsgerät
Scintillation Counter
Thermocycler Modell T3
Thermocycler RoboCycler Gradient 40
Vortex VF2
Vortexer
Waage (LP 6209)
Waage (SBC 21)
Wasser-Deionisierungsmaschine
Zentrifuge (5417 R)

Heraeus (Hanau, D)
Ziegra (Isernhagen, D)
Dynatech-Laboratories (Guernsey, UK)
Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Pharmacia Biotech (Freiburg, D)
Nikon GmbH (Düsseldorf, D)
Heraeus (Hanau, D)
Roche (Mannheim, D)
BMGLabtechnologies (Offenburg, D)
Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Zeiss (Jena, D)
Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Heraeus (Hanau, D)
WTW (Weilheim, D)
Kodak (Rochester, NY, USA)
Biorad (München, D)
Biorad (München, D)
Biometra (Göttingen, D)
Stratagene (Heidelberg, D)
Bender und Hobein AG (Zürich, CH)
Janke und Kunkel (Staufen, D)
Sartorius (Göttingen, D)
Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D)
SG Reinstwasser-Sys. (Hamburg, D)
Eppendorf (Hamburg, D)

2.1.2. Chemikalien

Brefeldin A	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FACSFlow	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACSSafe	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Geneticin g-418 Sulfat	GibcoBRL (Paisley, UK)
Heparin-Natrium	Ratiopharm (Ulm, D)
To-Pro-3-Iodid (TOPRO-3)	Molecular Probes (Leiden, NL)
Tris-Borat-EDTA (TBE)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

2.1.3. Reagenziensätze

Zellisolation mittels der MACS-Methode:

BDCA-4 Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD1c MicroBeads	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD11c MicroBeads	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
MACS-Isolation LD Columns	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
MACS-Isolation LS Columns	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
MACS-Isolation MS Columns	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Monocyte Isolation Kit	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA:

human IFN- α Module Set	Bender MedSystems (Wien, A)
human Interleukin (IL)-6 ELISA	BD Biosciences (San Diego, CA, USA)
human IL-12 p40 ELISA	BD Biosciences (San Diego, CA, USA)
human IL-12 p70 ELISA	BD Biosciences (San Diego, CA, USA)
human TNF- α ELISA	BD Biosciences (San Diego, CA, USA)
murin IFN- α ELISA Kit	PBL Interferon source (Piscataway, NJ, USA)

Luciferase-Messungen:

Luciferase Detection Reagent	Promega Corporation (Madison, WI, USA)
------------------------------	--

2.1.4. Materialien für die Zellkultur

Biocoll Separationsmedium	Biochrom (Berlin, D)
Bovines Serum-Albumin (BSA)	GibcoBRL (Paisley, UK)
Fötale Kälberserum (FCS)	GibcoBRL (Paisley, UK)
Humanes AB-Serum	BioWhittaker (Walkersville, MD, USA)
Humanes Serum-Albumin (HSA)	Pharmacia und Upjohn (Erlangen, D)
Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)	PAA (Linz, A)
Leucosept-Röhrchen	Greiner bio-one (Frickhausen, D)
L-Glutamin	PAA (Linz, A)

Phosphate-buffered saline (PBS)	PAA (Linz, A)
Penicillin	PAA (Linz, A)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)	
1640 Medium	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Streptomycin	PAA (Linz, A)

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner bio-one (Frickenhausen, D), Falcon (Heidelberg, D), Becton Dickinson (Le Pont de Claix, F), Bibby Sterilin (Stone, UK) und Corning (Corning, NY, USA) bezogen.

2.1.5. Zytokine, Wachstumsstimulatoren und Stimulanzen

<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (GM-CSF)	RundD Systems (Wiesbaden, D)
IL-3	RundD Systems (Wiesbaden, D)
IL-4	RundD Systems (Wiesbaden, D)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Lipopolysaccharid (LPS)	
(Herkunft: Salmonella typhimurium)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Murines GM-CSF	RundD Systems (Minneapolis, MN, USA)
Maus rIFN- α	PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, NJ, USA)
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Poly I:C	Invivogen (Toulouse, F)
R848	3M Pharmaceuticals (St. Paul, MN, USA)

2.1.6. Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

Folgende Medien und Puffer wurden für die Zellkultur verwendet:

<u>RPMI-Vollmedium:</u>	<u>RPMI-Vollmedium (PDC):</u>
100 U/ml Penicillin	100 U/ml Penicillin
100 μ g/ml Streptomycin	100 μ g/ml Streptomycin
1,5 mM L-Glutamin	1,5 mM L-Glutamin
10 Vol % FCS	10 Vol % FCS
in RPMI 1640-Medium	10 ng/ml IL-3
	in RPMI 1640-Medium
<u>MACS-Puffer:</u>	<u>Erythrozyten-Lysepuffer:</u>
2 mM EDTA	Ortho-mune Lysereagenz
0,5 Vol % BSA	in PBS
pH 7,2	
in PBS	

Lösungen für molekularbiologische Methoden:Transkriptionspuffer:

40 mM Tris-HCl [pH 8,0]
 10 mM Dithiothreitol (DTT)
 2 mM Spermidine-HCl
 20 mM MgCl₂

Waschpuffer (RNA):

100 mM NaCl
 4,5 mM EDTA
 10 mM Tris-HCl
 in 70 Vol % Ethanol

Waschpuffer (Reporterassays):

10 mM EDTA
 in PBS

Luciferase-Lysepuffer:

10 Vol % Glycerol
 1 Vol % Triton-X
 2 mM EDTA
 25 mM Tris-HCl [pH 7,8]
 2 mM DTT

Bindepuffer:

2,0 M Thiocyanat
 in 70 Vol % Ethanol

Elutionspuffer:

Nuclease-freies
 steriles Wasser

β-Gal-Assay (Lösung 1):

1 Vol % Galacton-Plus [TROPIX]
 0,1 Vol % 0,1 M MgCl₂
 20 Vol % 0,5 M Phosphat [pH 8]
 78,9 Vol % Wasser

β-Gal-Assay (Lösung 2):

20 Vol % 1 M NaOH
 10 Vol % Emerald [TROPIX]
 70 Vol % H₂O

TBE-Puffer:

89 mM Tris-Borat
 2 mM EDTA
 pH 8,3
 in Wasser

*2.1.7. Antikörper*Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper:

Bezeichnung	Spezifität	Klon	Herkunft
Anti BDCA-2	BDCA-2	AC144	Miltenyi Biotec
Anti BDCA-4	BDCA-4	AD5-17F6	Miltenyi Biotec
Anti CD1c	CD1c		BD/ Pharmingen
Anti CD11c	CD11c	B-ly6	BD/ Pharmingen
Anti CD14	CD14	3E2	BD/ Pharmingen
Anti HLA-A2	HLA-A0201	Poly	P. Fisch
Anti HLA-DR	HLA-DR	L243	BD/ Pharmingen
Anti IFN-α Ratte	Maus IFN-α	RMMA-1	PBL
Anti IFN-α Kaninchen	Maus IFN-α	Poly	PBL
Anti IL-4	IL-4	8D4-8	BD/ Pharmingen
Anti IL-12	IL-12 p40+p70	C8.6	BD/ Pharmingen
Anti Kaninchen Immunglobulin (Ig) G, HRP-conj.	Kaninchen IgG		ImmunoResearch
Anti TNF-α	TNF-α	mAb11	Endogen

2.1.8. Plasmide

Das Reporterplasmid pIFN- β -Luc wurde freundlicher Weise von T. Maniatis, RIG-I CARD2 von S. Rothenfusser zur Verfügung gestellt, während p125-Luc, RIG-I full, RIG-IC, RIG-I K270A und der leere Kontrollvektor von T. Fujita bezogen wurden. RIG-I Δ Helicase_C (AS 655-734) wurde aus RIG-I full über *Loop out Polymerase chain reaction* (PCR) mit dem folgenden Primerpaar hergestellt:

5'-ACTGAGTTTAGGATTCCTTCAATCC-3'

5'-GGTAGCCAAGTGCTTCCTTCTGA-3'

T7 D812N, eine T7 RNA Polymerase Punktmutante ohne Transkriptionsaktivität, wurde aus pSC6-T7-NEO – von M. Billeter überlassen - über punktspezifische Mutagenese ebenfalls aus zwei Primern synthetisiert:

5'-GCACTGATTCACGCCTCCTTCGGTACC-3'

5'-GGTACCGAAGGAGGCGTGAATCAGGTGC-3'

Beide durch PCR entstandenen Plasmide wurden zur Kontrolle sequenziert.

2.1.9. Material für RNA-Oligonukleotidsynthese und Aufreinigung

Molekularbiologische Methoden

DNA Oligonukleotide	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D)
DNase I	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D)
DNA Template	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D)
Klenow Fragment (Exo Klenow)	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D)
Mini Quick Spin TM Oligo Column	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
2'-O-Methyl-UTP	TriLink (Ronkonkoma, NY, USA)
Opti mRNA Kit	CureVac (Tübingen, D)
Promoter Oligonukleotid	Metabion GmbH (Martinsried, D)
Pseudouridin-5'-Triphosphat	TriLink (Ronkonkoma, NY, USA)
Roche high pure RNA Isolationskit	Roche Applied Science (Kulmbach, D)
Silencer siRNA construction Kit	Ambion (Warrington, UK)
2'-Thiouridin-5'-Triphosphat	TriLink (Ronkonkoma, NY, USA)
T7 RNA Polymerase	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D)
T7 RundDNA TM -Polmerase	Epicentre (Omaha, NE, USA)

Die folgende Tabelle zeigt für die in vitro Transkription eingesetzten DNA-Templates:

Name	Sequenz
9.2s	5'-TTGAAGGACAGGTTAAGCTAATAGTGAGTCG-3'
Tri-09-mer	5'-GGGATCCCCTATAGTGAGTCGTA-3'
Tri-12-mer	5'-GGGTTCATCCCCTATAGTGAGTCGTA-3'
Tri-15-mer	5'-GGGAAGTTCATCCCCTATAGTGAGTCGTA-3'

Tri-18-mer	5'-GGGCTGAAGTTCATCCCCTATAGTGAGTCGTA-3'
Tri-21-mer	5'-GGGACCCTGAAGTTCATCCCCTATAGTGAGTCGTA-3'
Tri-24-mer	5'-GGGCTGACCCTGAAGTTCATCCCCTATAGTGAGTCGTA-3'
Tri-27-mer	5'-GGGAAGCTGACCCTGAAGTTCATCCCCTATAGTGAGTCGTA-3'
Tri-GFPa	5'-AAGATGAAGTTCAGGGTCAGCCCCTATAGTGAGTCGTA-3'
Tri-GFPs	5'-AAGCTGACCCTGAAGTTCATCCCCTATAGTGAGTCGTA-3'

2.1.10. Chemisch synthetisierte RNA

Chemisch synthetisierte RNA wurde von Eurogentec (Leiden, B) bezogen.

2.1.11. Oligodesoxynukleotide

Komplett oder teilweise Phosphorothioat-modifizierte Oligodesoxynukleotide wurden freundlicherweise von Coley Pharmaceutical Group (Wellesley, MA, USA) zur Verfügung gestellt. Kleine Buchstaben stehen für Verknüpfung durch Phosphorothioate, große Buchstaben für Verknüpfung durch Phosphodiester am 3'-Ende der Base. Fett gedruckt sind die jeweiligen CpG-Dinukleotide:

Bezeichnung	Nukleotid-Sequenz (5' → 3')	Referenz
Oligodesoxynukleotid (ODN) 1826 ODN 2006 ODN 2216	tccatgaacggtcctgacgtt tcgtcg ttttgt cg ttttgt cg tt ggGGGAC GATCG TCgggggG	(Hartmann, 2000a) (Krug, 2001a)

2.2. Zellen

In den der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegenden Experimenten wurde sowohl mit primären Blutzellen (siehe 2.3.3.), als auch mit einer humanen Zelllinie, sowie mit murinen Zellen gearbeitet.

2.2.1. Humane Zelllinie

Folgende Zelllinie wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Zelllinie	Zellart	Referenz
HEK-293	Humane embryonale Nierenzellen	(Graham F L, Smiley J 1977)

2.2.2. Murine Zellen

Zum Einsatz kamen Knochenmarkstammzellen aus TLR7 *Knockout*-Mäusen die uns freundlicher Weise von Akira zur Verfügung gestellt wurden.

2.3. Zellulär-immunologische Methoden

2.3.1. Zellkultur

2.3.1.1. Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5%igen CO₂ Luftgemisch. Sämtliche Experimente und Manipulationen mit Zellen wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen in einem Laminar-Air-Flow durchgeführt.

2.3.1.2. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde der Trypanblauausschlusstest durchgeführt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aus, tote Zellen werden blau angefärbt. Zellzahlen wurden durch Auszählen geeigneter Verdünnungen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2.3.1.3. Kultivierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Aufgereinigte Zellpopulationen sowie *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) wurden in 96-Well Rundboden-Platten in RPMI-Vollmedium mit 10 % FCS, 1,5 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Den PDC wurde zusätzlich 10 ng/ml IL-3 zugesetzt.

Die Zellkonzentration wurde, mit Ausnahme der PDC ($2,5 \times 10^5$ Zellen/ml), in der Regel auf 2 Millionen (Mio) Zellen pro Milliliter eingestellt.

2.3.1.4. Kultivierung von HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen (*human embryonic kidney*) wurden in Petrischalen oder 25 - 75 ml Kulturflaschen in RPMI-Vollmedium mit 10 % FCS, 1,5 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf Anzeichen von Zelluntergang oder mikrobieller Verunreinigung inspiziert. Das Medium wurde, dem Zell-Wachstum entsprechend, alle zwei bis drei Tage dekantiert und durch frisches Medium substituiert. In sämtlichen Zelllinien wurde eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen ausgeschlossen.

2.3.1.5. Kultivierung muriner Knochenmarkzellen

Zur Generierung muriner dendritischer Zellen wurden gepoolte Knochenmarkzellen mit Maus-GM-CSF für 7 Tage inkubiert, bis diese Kultur typischer Weise über 90 % murine dendritische Zellen (CD11c+, CD11b+, B220-) mit einer Vitalität von über 95 % (Trypanblauausschluss) enthielt. Kulturdichte und Mediumzusammensetzung entsprachen den humanen Kulturen.

2.3.2. Durchflusszytometrie

2.3.2.1. Allgemeines Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie mittels eines *Fluorescence-activated cell sorters* (FACS) bietet die Möglichkeit, Zellen anhand ihres Phänotyps zu unterscheiden und zu quantifizieren. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen ein entsprechendes Oberflächenantigen markiert und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom hintereinander einzeln durch einen Laserstrahl geführt.

Zelleigenschaften wie Größe, Form, Membranoberfläche und intrazelluläre granuläre Bestandteile führen zu einer Lichtstreuung, die von je einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) und einer rechtwinklig dazu angebrachten (Seitwärtsstreulicht) gesammelt und photometrisch detektiert wird. Das Vorwärtsstreulicht wird wesentlich durch die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Die gewünschte Zellpopulation wird anhand dieser Kriterien ausgewählt und weiter auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Der Laserstrahl regt das Chromophor der für die Oberflächenmarkierung verwendeten Antikörper zur Emission von Lichtquanten an, die durch eine Linse gesammelt werden. Filter trennen das gesammelte Licht nach Wellenlängenbereichen und lenken es zu unterschiedlichen Detektoren. So können die Signale mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Mehrfarbenanalyse getrennt aufgenommen und quantitativ ausgewertet werden. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der untersuchten Oberflächenmoleküle. Zu diesen Fähigkeiten der FACS-Analyse kommt beim FACS-Sorter noch die Möglichkeit dazu, die so charakterisierten Zellen einzeln in Tropfen zu verpacken, diese mit einer elektrischen Ladung zu versehen und zwischen Kondensatorplatten abzulenken, so dass Zellen nach ihren Eigenschaften aufgetrennt und in verschiedene Auffanggefäße sortiert werden können.

Bei der direkten Immunfluoreszenz werden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet, die direkt an Oberflächenmoleküle binden. Bei dem Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz werden die Zellen in einem ersten Schritt mit einem unmarkierten Antikörper inkubiert und erst in einem zweiten Schritt mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gefärbt, der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet ist.

Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten durch die Lichtfilter gelingt nicht vollständig, da sich die Spektren der eingesetzten Farbstoffe zum Teil überlappen. Diese Überlappung wird durch Kompensation korrigiert, indem von jedem registrierten Fluoreszenzsignal der Anteil abgezogen wird, der durch Überlappung entsteht. Dazu werden bei jedem Versuch Kontrollproben hergestellt, bei denen jeweils nur eine Eigenschaft mit einem bestimmten Fluorochrom angefärbt ist, während die anderen Fluorochrome, gebunden an geeignete Isotypen-Antikörper, als Negativkontrolle dienen. So wird sichtbar, wie stark ein bestimmtes Fluorochrom in die anderen Kanäle hineinstrahlt und die Kompensation ermöglicht. Ebenso kann mit Hilfe der Isotypen die Signalverstärkung der einzelnen Kanäle so justiert werden, dass sich Zellen mit entsprechenden Antigenen bzw. Eigenschaften qualitativ und quantitativ unterscheiden und vergleichen lassen.

Übersicht über verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und die dazugehörigen maximalen Emissions- und Exzitations-Wellenlängen:

Fluoreszenzfarbstoff	Exzitation	Emission
Fluorescein-Isocyanat (FITC)	494 nm	518 nm
Phycoerythrin (PE)	565 nm	575 nm
Allophycocyanin (APC)	650 nm	660 nm
Peridinin-Chlorophyll-A-Protein (PerCP)	488 nm	675 nm

2.3.2.2. Bestimmung von Oberflächenmolekülen

Für FACS-Analysen wurden 5×10^5 - 3×10^6 Zellen in einem FACS-Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen im zurücklaufenden Tropfen resuspendiert. Zur Färbung wurden die Zellen daraufhin 15 Minuten bei 4 °C unter Lichtausschluss mit FITC, PE, PerCP oder APC gekoppelten Antikörpern (direkte Fluoreszenz) bzw. einem unmarkierten Antikörper (indirekte Fluoreszenz) inkubiert und anschließend mit PBS einmal gewaschen. Bei indirekter Fluoreszenz wurde anschließend der Inkubationsschritt, diesmal mit einem fluoreszenzgekoppelten Isotyp-spezifischen Antikörper, wiederholt. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen wurde auf einem FACSCalibur gemessen und anschließend mit Hilfe der *Cell Quest Software* analysiert. So wurde die Reinheit der wie im Folgenden beschrieben, durch *Magnetic Cell Sorting* gewonnenen Zellpopulationen überprüft.

2.3.3. Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Um die Reaktion einzelner Blutzelltypen gezielt zu untersuchen, isoliert man einzelne Populationen aus dem heterogenen Gemisch des peripheren venösen Blutes.

2.3.3.1. Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation

Gesunden, freiwilligen, erwachsenen Spendern wurde je 200 ml Blut in heparinisierte Spritzen abgenommen, wobei pro 50 ml Blut etwa 200 µl Heparin verwendet wurden. Das Blut stand bei Raumtemperatur maximal 2 Stunden, bevor daraus die Fraktion der mononukleären Zellen präpariert wurde.

In einem ersten Schritt wurde das humane Blut über die Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert. Dazu wird es zunächst auf mit Biocoll-Separationsmedium vorbereitete Leucosept-Röhrchen gegeben und 15 Minuten bei 800 g und einer Temperatur von 20 °C zentrifugiert. Eine poröse Polyethylen-Trennscheibe im Zentrifugenröhrchen verhindert die Mischung von Probenmaterial und Separationsmedium. Dieses Medium besitzt eine höhere Dichte als Lympho-, Mono- und Thrombozyten, jedoch eine geringere als die roten Blutkörperchen und die meisten Granulozyten. So kann das heterogene periphere Blut in dichteverschiedene zelluläre Bestandteile getrennt werden. Die obere Phase enthält das Plasma, die Interphase besteht aus mononukleären Blutzellen, die sich durch ihre geringere Dichte auf der mittleren Ficoll-Paque-Phase auflagern, dabei aber durch Basophile und Thrombozyten kontaminiert sein können, während die übrigen Granulozyten und die Erythrozyten im Sediment zu finden sind. Nach der Zentrifugation wurden die PBMC vorsichtig auf 50 ml *Blue Caps* mit 25 ml sterilem, 0,9 %igen NaCl-Lösung (Verdünnung 1:2) überführt und anschließend bei 500 g und 20 °C für 10 Minuten gewaschen. Im Folgenden wurden alle *Pellets* eines Spenders gepoolt und es erfolgte ein weiterer Waschschrift in NaCl-Lösung bei 400 g für 7 Minuten (4 °C). Nun wurde das Pellet mit 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert. Durch hypotone Lyse können so eventuell störende Erythrozyten-Kontaminationen minimiert werden. Nach einer Inkubationszeit bei Raumtemperatur, die wegen der Zelltoxizität 5 Minuten nicht überschreiten sollte, wurde die Reaktion mit NaCl-Lösung gestoppt und die Zellen erneut in der Zentrifuge gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in das gewünschte Kulturmedium oder den Folgeschritten entsprechenden Puffer aufgenommen und der Anteil der lebenden Zellen mit Hilfe der Trypanblaufärbung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurden nur solche mononukleäre Zellfraktionen weiterverwendet, von denen über 95 % den Supravitalfarbstoff Trypanblau dank intakter Zellmembranen ausschlossen. Für

einen direkt anschließenden Versuch wurden die PBMC in die gewünschte Konzentration, in der Regel eine Zellzahl von 2 Mio. Zellen/ml verdünnt und je 200 µl pro Vertiefung in 96-Well Zellkulturplatten pipettiert.

2.3.3.2. Aufreinigung mittels magnetischer Zellsortierung

Zur Anreicherung und Isolierung gezielter Zellpopulationen wurde die *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS)-Isolationsmethode verwendet. Dabei wird ein Zellgemisch mit Antikörpern versetzt, die wie ein Schlüssel zu bekannten, auf der Oberfläche exprimierten Epitopen oder Rezeptoren der Zielzellen passen. So werden Zellen mit speziellen Antikörpern markiert, die an magnetische Mikropartikel mit einem Durchmesser von etwa 50 nm gekoppelt sind. Diese Reaktion der Microbead-Bindung läuft 15 Minuten in einem speziellen MACS-Puffer bei 4 °C ab. Anschließend werden die markierten Zellen gewaschen und in MACS-Puffer resuspendiert. Im Folgenden wird die markierte Zellsuspension zur Separation auf eine Trennsäule gegeben, die eine magnetische Matrix enthält. Die Säule wird in das Magnetfeld eines starken Permanentmagneten gebracht. Dadurch werden alle mit Microbeads beladenen Zellen in der Matrix zurückgehalten. Alle unmarkierten Zellen werden durch mehrmaliges Spülen mit MACS-Puffer aus der Säule entfernt, so dass nur die gewünschte Zellpopulation in der Säule zurückgehalten wird. Anschließend lässt sich die markierte Zellpopulation aus der Säule außerhalb des Magnetfelds eluieren. Sowohl die markierte als auch die unmarkierte Zellfraktion kann anschließend in Kultur genommen werden. Das Funktionsprinzip des MACS-Systems ermöglicht also sowohl die Anreicherung (positive Selektion), als auch den Ausschluss einer Zellpopulation (Depletion) aus einer Gesamtzellpopulation. Zur Aufreinigung nach der MACS-Methode wurden in dieser Arbeit ausschließlich Reagentsätze der Firma Miltenyi Biotec nach dem entsprechenden Hersteller-Protokoll verwendet. So wurden beispielsweise PDC mit anti-BDCA-4 Antikörpern markiert und über eine LS- und MS-Säule geleitet. Ihre Reinheit (lineage-negativ, MHC-II-positiv, CD123-positive Zellen) betrug über 95 %.

2.3.4. Zellstimulation

Die in 96-Well-Platten ausplattierten Blutzellen wurden mit 200 ng gereinigter RNA pro Well stimuliert. Dazu wurden die Nukleinsäuren mit 0,5 µl *Lipofectamine* 2000 versetzt. Diese Menge ergab sich aus eigenen Vorversuchen zur Dosis-Wirkungsbeziehung, sowie Transfektionseffizienz und Toxizität. Als Kontrollstimulantien wurden CpG-ODN, R848 und Poly I:C eingesetzt. Die Platten wurden 24 bis 36 Stunden nach Stimulation 3 Minuten bei 100 g zentrifugiert und anschließend die Überstände zellfrei abgenommen und weitere Analysen eingeleitet oder bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.5. Enzyme-linked immunosorbent assay

Zur Bestimmung von Proteinen im Überstand von Zellkulturen wurden verschiedene *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) durchgeführt. Neben der kompetitiven ELISA-Technik, kam im Rahmen dieser Arbeit auch die meist sensitivere Sandwichvariante zum Einsatz.

2.3.5.1. Die kompetitive Form

In einem ersten Schritt jedes ELISA muss ein Antikörper an eine feste Phase gebunden werden. Dazu wurden speziell beschichtete Mikrotiterplatten im 96-Well-Format mit einer Lösung aus Coating Puffer und Protein-spezifischen Antikörpern gefüllt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wird diese Pufferlösung durch Ausschlagen entfernt und die Platte mit Waschpuffer gespült. Um Hintergrundaktivität durch unspezifische Proteinbindung zu minimieren, ist das Abblocken freier Bindestellen essentiell. Dazu sollte die Platte mit dem entsprechenden Assay Puffer für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und erneut gewaschen werden.

Im Folgenden differiert das Vorgehen in kompetitiven und Sandwich-ELISA-Messungen. Um Interferon- α zu detektieren wurde der kompetitive Typ eingesetzt: Neben Proben aus zellfreien Kulturüberständen und einer Standardreihe mit bekannter Proteinmenge wird ein mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) markierter Antikörper in die einzelnen Wells pipettiert. Während einer sich anschließenden 2-stündigen Inkubationszeit bindet nachweisbares Protein (z.B. Interferon) an die Antikörper und wird wiederum vom HRP-Konjugat gekoppelten Antikörper erfasst.

Im weiteren Vorgehen entsprechen sich die unterschiedlichen, beschriebenen ELISA-Formen erneut: Nach Entfernung des Konjugats durch einen weiteren Waschschrift gibt man gelöstes Substrat hinzu, welches gebundenes Enzym nun zu Farbstoff umsetzt. Die Farbintensität, die proportional zur Enzym- und somit zur Protein-Konzentration der Probe ist, wird dann mittels eines ELISA-Readers photometrisch bestimmt. Die Standardreihe ermöglicht die genaue Berechnung der in der Probe enthaltenen Protein-Konzentration.

2.3.5.2. Das Sandwich-Prinzip

Der „Sandwich-ELISA“ verwendet zwei Antikörper, die beide spezifisch, allerdings an unterschiedlichen Stellen, an das nachzuweisende Antigen binden. Anders als im kompetitiven ELISA inkubieren Proben und Standard zunächst ohne weitere Zugaben auf der Platte. Erst nach der Bindung vorhandenen Proteins an einen ersten, so genannten *Coating*-Antikörper - ein Antikörper, der etwa an die feste Phase einer 96-Well-Platte gebunden hat - und mehreren Waschschriften wird nun ein zweiter, biotinylierter Antikörper zugegeben, der das bereits gebundene Protein an einem anderen Epitop bindet; ebenso wird ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zugegeben, welches an das Biotin des Antikörpers bindet. Durch Verwendung mehrerer Biotin-Streptavidin-Brücken pro Antikörper, wird eine Signalverstärkung und somit eine höhere Sensitivität erreicht. Coating-Antikörper, Probenprotein, Detektionsantikörper und das Streptavidin-gekoppelte Enzymkonjugat liegen nun, der Bezeichnung entsprechend, wie die verschiedenen Schichten eines Sandwichs übereinander. Nach Entfernung in einem weiteren Waschschrift gibt man die Substratlösung hinzu. Das folgende Protokoll entspricht wieder dem des kompetitiven Typs.

Auf diesem Funktionsprinzip beruhen die von der Firma BD eingesetzten ELISA für IL-6, IL-12 und TNF- α sowie die Messung von murinem INF- α : Als *Coating*-Antikörper wurde monoklonales Ratten anti-Maus IFN- α (Klon RMMA-1) eingesetzt und zur Detektion diente polyklonales anti-Maus Kaninchenserum zusammen mit HRP-konjugiertem anti-Kaninchen IgG vom Esel als sekundärer Antikörper. Als Standard wurde murines rIFN- α eingesetzt.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. Reporterassays

Als eine weitere Methode zur Messung der Interferon-Aktivität wurden parallel Reporterassays durchgeführt.

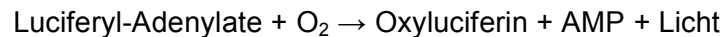
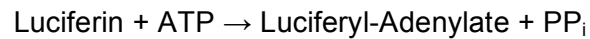
2.4.1.1. Transfektion mit Poly-Ethylen-Imin

12 bis 16 Stunden vor einer Transfektion wurden HEK-293-Zellen in 48-Well-Platten gegeben. Bei einer Konfluenz von etwa 80 % wurden verschiedenen Plasmide in die Zellen transfiziert. Dazu wurde Poly-Ethylen-Imin (PEI) verwendet. PEI ist ein stark basisches und verzweigtes Molekül, dessen Aminogruppen bei Zugabe von Wasser protoniert werden. Dementsprechend liegt es in wässriger Lösung als Polykation vor und ist deshalb - ebenso wie Lipofectamine - geeignet, negativ geladene Nukleinsäuren zu komplexieren und über die ebenfalls negativ geladene Zellmembran in das Zytoplasma zu führen. Aus eigenen Vorversuchen zur Transfektionseffizienz und Zelltoxizität ergab sich ein optimales Verhältnis bei 2,3 µl PEI, 1,5 µg DNA und 25 µl OptiMem pro Well.

2.4.1.2. Interferon- β -Messung im Luciferase-Assay

Ziel verschiedener Versuche war es, die Interferon- β -Induktion nach Stimulation mit RNA, in vitro Transkription, sowie die Bedeutung von RIG-I zu untersuchen. Dazu wurden in jedes Well 300 ng des Reporterplasmids pIFN β -luc gegeben. In diesem Plasmid folgt dem IFN- β -Promotor ein Gen, das für Luciferase kodiert, ein Enzym, das eine Lichtreaktion katalysiert. Kommt es also zur Induktion von IFN- β , entsteht proportional dazu Luciferase, deren Konzentration wiederum proportional zu einer einfach messbaren Lichtreaktion ist. Luciferase diente also als Reportergen.

Auf der Grundlage dieses Prinzips wurde mit folgenden Assays gearbeitet: 24 Stunden nach Transfektion wurde das Medium abgesaugt und die Zellen ein Mal in 0,5 ml PBS mit 10 mM EDTA gewaschen. Dann erfolgte eine Lyse in 50 µl Luciferase Lyse-Puffer aus 10 % Glycerol, 1 % Triton-X, 2 mM EDTA, 25 mM TrisHCl [pH 7,8] und 2 mM DTT. 20 µl jeder Probe wurde mit 20 µl Luciferase-Detektions-Reagenz versetzt. Das darin enthaltene Pigment Luciferin ist Substrat in der 2-schrittigen ATP-abhängigen - durch Luciferase katalysierten - Lumineszenzreaktion:



Das in dieser Oxidation entstehende Licht (Photonen-Emission) wurde mit einem Luminometer entsprechend der Gebrauchsanweisung erfasst und die Luciferase-Aktivität ermittelt.

2.4.1.3. *β*-Galacton-Assay

Neben dem Reportervektor wurden 500 ng pSV-*β*-Galactosidase in jedes Well gegeben. Durch die Bestimmung der *β*-Galaktosidase-Aktivität kann sowohl Transfektionseffizienz und Vitalität der Zellen überprüft werden, als auch eine Normalisierung des Luciferase-Aktivität-Werts des selben Extrakts erfolgen. Dazu wurden 10 μl der wie oben beschrieben hergestellten Lysate für 20 Minuten mit 100 μl der Lösung 1 inkubiert. Diese bestand aus 1 % Galacton-Plus, 0,1 % 0.1M MgCl_2 , 20 % 0,5M Phosphat [pH 8] und 78,9 % H_2O . Dann wurden 50 μl der Lösung 2 aus 20 % 1M NaOH, 10 % Emerald und 70 % H_2O zugegeben. SV-Promotor und -Enhancer regulieren die Transkription des bakteriellen *lacZ*-Gens, das wiederum für das Reporterenzym *β*-Galactosidase kodiert. Ihre Aktivität wurde mit Hilfe der beschriebenen Chemilumineszenz-Assays an Hand des Umsatzes von *β*-Gal ebenfalls im Luminometer erfasst und mit den oben genannten Parametern korreliert.

2.4.2. *In vitro*-Synthese von RNA

In vitro transkribierte RNA wurde mit einem Silencer siRNA Kit oder entsprechend dem folgenden Protokoll hergestellt: Durch den Einsatz teilweise überlappender einzelsträngiger DNA-Oligonukleotide wurde mit Hilfe von Exo-defizienter Klenow Polymerase - einem Anteil der E.coli DNA Polymerase I mit alleiniger 5'=>3' Polymerase-Aktivität - ein doppelsträngiges DNA-Template hergestellt. Danach wurde ein 2500 Nukleotide langes Transkript synthetisiert und dabei ein Kontroll-Template des Opti mRNA Kit verwendet (Ambion).

Templates aus dem Vektor pBlueskript KS (pBKS) wurden mittels PCR hergestellt. Sie enthielten einen T7 Polymerase-Promotor vor der zu transkribierenden Sequenz. Ein Ansatz enthielt 20 pmol DNA, 30 U T7 RNA Polymerase, 40 U RNase-Inhibitor sowie 0,3 U anorganische Hefe-Pyrophosphatase in einem Puffer aus 40 mM Tris-HCl mit pH 8,0, 10 mM DTT, 2 mM Spermidine-HCl und 20 mM MgCl_2 . Die in vitro Transkriptionen

liefen über Nacht bei 37 °C. Am nächsten Morgen wurden die DNA-Templates mit DNase I verdaut. Im Folgenden wurde die RNA mit Hilfe des Roche High Pure RNA Isolations-Kit und folgenden Modifikationen gereinigt: *Binding buffer* war 2,0M Guanidin-Thiocyanat in 70 %igem Ethanol; als Waschpuffer wurde 100 mM NaCl, 4,5 mM EDTA und 10 mM Tris HCl wiederum in 70 % Ethanol eingesetzt. Nach der Elution wurde die RNA auf eine *Mini Quick SpinTM Oligo* Säule gegeben und dadurch überschüssige Salze entfernt. Gecappte RNA wurde mit dem Opti mRNA Kit der Firma Curevac transkribiert.

2.4.3. Gelelektrophorese

Die Größe und Integrität der RNA wurde durch Gelelektrophorese überprüft.

Zur Auftrennung von RNA-Fragmenten wurde ein 1 %iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 2,0 g Agarose mit 200 ml TBE-Puffer in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid, wurde es in die vorgegebene Gelwanne gegossen und eine Stunde lang bei Raumtemperatur abgekühlt. Durch Einbringen in die Elektrophorese-Kammer wurde das Gel mit TBE-Puffer überschichtet. Nach Entfernen des Kammes wurden die RNA-Proben im Verhältnis 1:6 mit Ladepuffer in die Geltaschen gegeben. Der Ladepuffer enthielt einen Farbstoff, der das Einpipettieren erleichterte und Glycerin, das auf Grund seiner höheren Dichte ein rasches Absinken in die Taschen bewirkte. Nun wurde ein elektrisches Feld angelegt. Da der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid sich in die Nukleotidstränge einlagert, konnte die Auftrennung der DNA-Fragmente im UV-Licht (366 nm) kontrolliert werden und die Gele wurden im Anschluss an die Elektrophorese im UV-Licht mit einer Polaroidsofortbildkamera fotografiert.

2.4.4. Konzentrationsbestimmung von RNA-Oligonukleotiden

Die Konzentration von DNA und RNA-Oligonukleotiden wurde mit einem Spektrometer bestimmt. Es wurde meist ein komplettes Absorptionsspektrum von 220 bis 320 nm der Nukleinsäure-Lösung in H₂O aufgenommen und die optische Dichte beim Absorptionsmaximum um 260 nm bestimmt. Einer OD₂₆₀ von 1 entsprechen dann etwa 20 µg/ml eines Oligonukleotids.

2.5. Statistische Analyse

Bei mehreren gleichen Versuchen sind die Ergebnisse als arithmetisches Mittel angegeben, wobei die Streuung der Werte jeweils als Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of mean*, SEM) dargestellt werden. Die rechnerische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels der Programme Microsoft Excel und Microsoft PowerPoint (Microsoft Cooperation, CA, USA).

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Interferon-Induktion

3.1.1. Triphosphat-abhängige Interferon-Induktion

Die Abhängigkeit der Interferon-Induktion von einem Triphosphat am 5'-Ende kurzer RNA wurde 2004 von Kim et al. an somatischen Zellen beschrieben. Um diese Beobachtung an Zellen des peripheren Bluts nachzuvollziehen, wurden mononukleäre Zellen (PBMC) isoliert und anschließend verschiedene Populationen aufgereinigt und angereichert. Nach Kultivierung in einer definierten Konzentration wurden etwa Monozyten mit doppelsträngigen RNA-Oligonukleotiden (zur Synthese-Methodik siehe 2.4.2.) transfiziert. Nach 36 Stunden wurden zellfreie Überstände abgenommen und mit Hilfe von ELISA die Interferon- α -Produktion bestimmt. In Abbildung 6 ist die Triphosphat-abhängige Induktion in Monozyten dargestellt: Während nach Gabe derartiger Oligonukleotide über 3000 pg INF- α /ml gemessen wurden, sinkt die Induktion nach dem Verdau des endständigen Triphosphats durch eine Rnase drastisch auf eine kaum messbare Konzentration. Bei der eingesetzten Rnase T1 handelt es sich um eine Endoribonuklease, die einzelsträngige RNA spezifisch an Guanosin-Enden spaltet. In plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC) hingegen spielt die endständig lokalisierte Triphosphat-Gruppe keine entscheidende Rolle für die Interferon-Induktion (Daten nicht gezeigt).

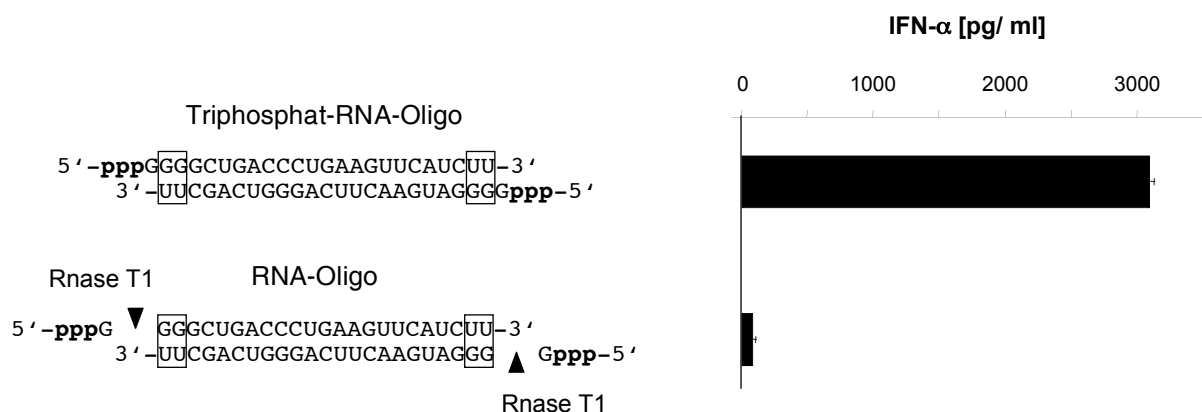


Abbildung 6:

Monozyten aus gesunden Spendern wurden mittels MACS aufgereinigt und in einer Konzentration 2 Mio. Zellen/ml in 96-well Platten ausplattiert. Doppelsträngige RNA-Moleküle wurden anschließend mit Lipofectamine 2000 transfiziert (200 ng / Transfektion). 36 h nach Transfektion wurden die Überstände abgenommen und im ELISA die IFN- α -Produktion bestimmt. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen \pm Standardfehler der Mittelwerte (SEM).

3.1.2. Toll-like-Rezeptor-unabhängige Interferon-Antwort

3.1.2.1. Interferon-Induktion durch Triphosphat-RNA bei TLR7-Knockout-Maus

entspricht der Interferon-Induktion bei TLR7-Wildtyp

Hornung et al. konnten 2005 eine sequenzabhängige Interferon-Induktion durch *small interfering RNA* (siRNA) in humanen PDC zeigen (Hornung et al. 2005). TLR7 wurde dabei als erkennende Schlüsselstruktur nachgewiesen. Bereits die Unabhängigkeit der Detektion von endständigem Triphosphat in den „klassischen Interferon-produzierenden Zellen“ im Gegensatz zu anderen Populationen, legt zumindest die Beteiligung eines weiteren, TLR7-unabhängigen Mechanismus nahe.

Um dies weiter zu untersuchen, wurde ein Versuch an Knochenmark-Zellen von TLR7-*Knockout*-Mäusen durchgeführt. Zur Kontrolle dienten C57BL/6-Wildtypmäuse. Dazu wurden murine Zellen mit Triphosphat-RNA-Oligonukleotiden transfiziert. Als Kontrollstimulantien verwendeten wir den TLR9-Agonisten CpG-A (ODN2216) und den TLR7-Liganden R848. Nach 36 Stunden wurde die Interferon-Produktion mittels ELISA bestimmt. In den Zellen aus den TLR7-*Knockout*-Mäusen war, wie zu erwarten, keine Stimulation durch den TLR7-Agonisten R848 nachweisbar, während über den selektiven TLR9-Liganden CpG-A in beiden Gruppen Interferon induziert wurde. Auch durch Triphosphat-RNA-Oligonukleotide konnten wir TLR7-unabhängig eine Antwort messen, wohingegen durch RNA-Oligonukleotide ohne Triphosphatanhang nur in Wildtypzellen vergleichsweise niedrige Interferon-Konzentrationen erfasst wurden (Abbildung 7).

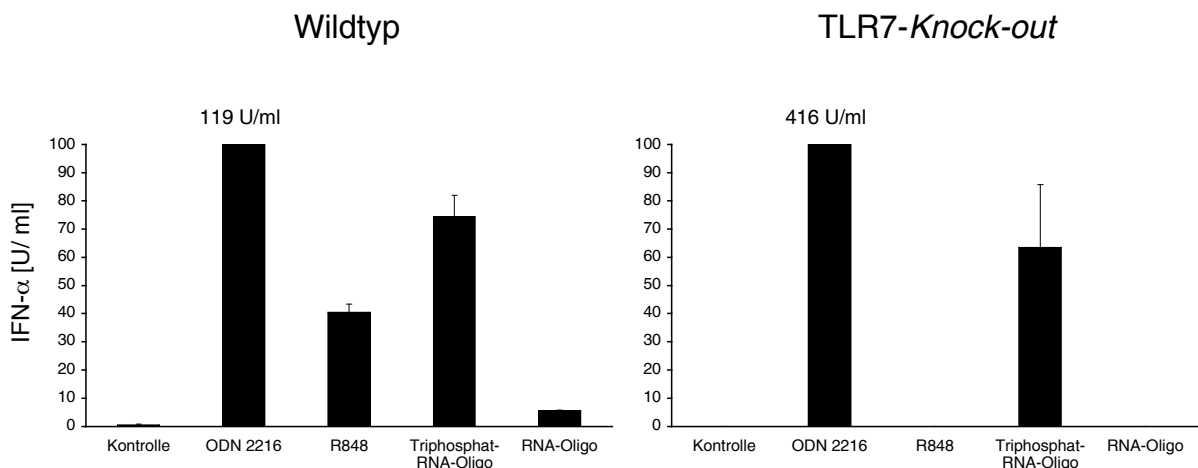


Abbildung 7:

Knochenmark wurde aus C57BL/6-Wildtypmäusen und TLR7-*Knockout*-Mäusen isoliert und zu 2 Mio Zellen/ml in 96-well Platten ausplattiert. Doppelsträngige RNA-Moleküle wurden anschließend mit Lipofectamine 2000 transfiziert (200 ng/Transfektion). Als Kontrollstimulantien wurden CpG-A (ODN2216; 3 µg/ml) und R848 (10 µM) eingesetzt. 36 h nach Transfektion wurden die Überstände abgenommen und im ELISA die IFN-α-Produktion bestimmt. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen ± SEM.

3.1.2.2. Unabhängigkeit von endosomaler Reifung

Die Ligandenerkennung über endosomal lokalisierte *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) wird durch Chloroquin unterbunden. So führt sowohl einzelsträngige RNA über TLR7/8, als auch DNA mit unmethylierter CpG-Motiven über TLR9 in Gegenwart steigender Chloroquinmengen zu einer zunehmend reduzierten Interferoninduktion. Um somit die Bedeutung endosomaler TLR zu untersuchen, präinkubierten wir aufgereinigte mononukleäre Blutzellen (PBMC) mit ansteigenden Chloroquindosen (39-625 ng/ml). Anschließend wurden die Zellen entweder mit CpG-Oligonukleotiden - also selektiven TLR9-Liganden - stimuliert oder Triphosphat-RNA transfiziert. Durch steigende Chloroquin-Konzentrationen wurde die Interferon- α -Induktion durch CpG, nicht aber durch Triphosphat-RNA unterbunden (Abbildung 8).

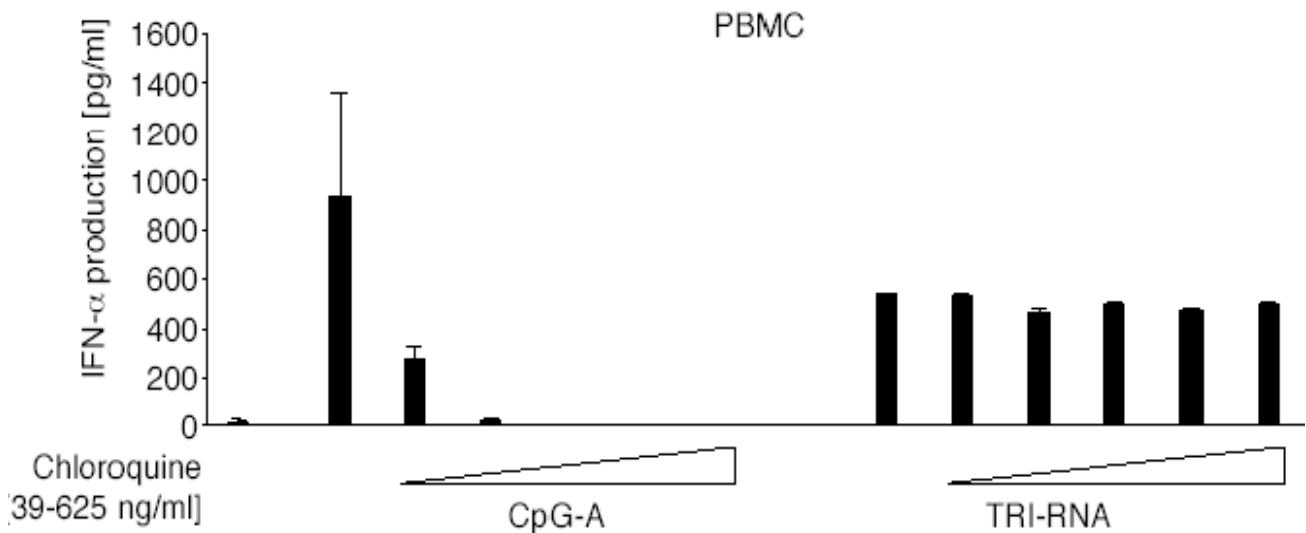


Abbildung 8:

Aufgereinigte PBMC wurden mit ansteigenden Chloroquindosen (39-625 ng/ml) inkubiert und im Anschluss mit CpG-A (3 μ g/ml) stimuliert oder mit Triphosphat-RNA (TRI-RNA) transfiziert. Nach 24 Stunden wurden Überstände abgenommen und die Interferon- α -Produktion mittels ELISA bestimmt. Die Daten zweier unabhängiger Spender sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.2. Identifizierung zellulärer Hauptproduzenten von

Typ-I-Interferon im peripheren Blut

3.2.1. PDC-unabhängige Interferon-Induktion

Interferon- α -Produktion im menschlichen Immunsystem gilt hauptsächlich als Domäne der PDC, die auch IPC für *Professional type-I interferon-producing cells* genannt werden. Dabei wird die Herstellung und Ausschüttung des Interferons durch die Aktivierung von TLR7 und 9 getriggert. Bereits die bisher dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass wir einem von diesen bekannten molekularen Prozessen abweichenden Mechanismus auf der Spur waren.

3.2.2. Monozyten als Hauptproduzenten im peripheren Blut

Um die an den bereits beschriebenen Prozessen beteiligte Zellpopulation zu identifizieren, führten wir ein Zelldepletionsexperiment durch. Nach Separation primärer Blutzellen in Subpopulationen stimulierten wir diese wiederum mit Triphosphat-RNA. Nach Entfernung der PDC – der klassischen Interferonproduzenten – war nach wie vor eine Interferonantwort nachweisbar. Nach Abtrennung der CD-14-positiven Zellen, also der Monozyten, war keine Antwort mehr messbar. Nach Konzentration CD-1c-exprimierender Zellen – Monozyten und monozytären dendritischen Zellen - hingegen konnte ein starker Signalanstieg gemessen werden (Abbildung 9).

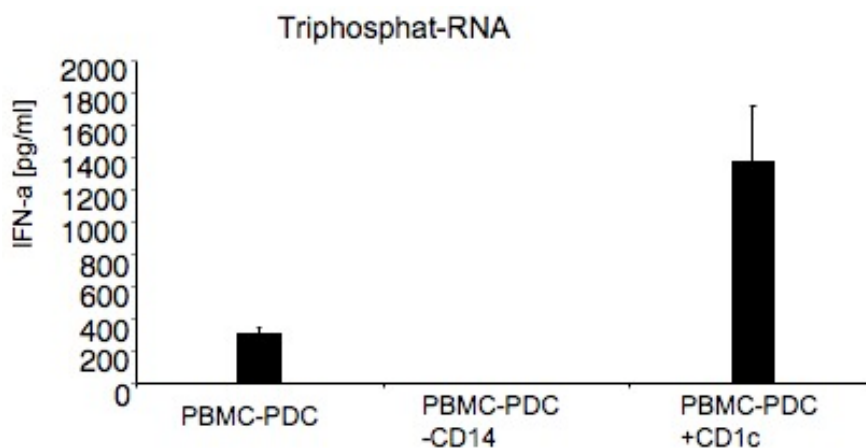


Abbildung 9:

Primäre Blutzellen wurden mittels MACS in Subpopulationen aufgereinigt und mit Triphosphat-RNA-Oligonukleotiden stimuliert. Nach 36 Stunden wurde die Interferon- α -Induktion mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Experimenten \pm SEM.

3.3. Charakterisierung der immunmodulatorischen small interfering RNA

In den folgenden Experimenten wurde der Ligand, die Triphosphat-RNA, weiter charakterisiert.

3.3.1. Einzel- und doppelsträngige sowie sense- und antisense

Triphosphat-RNA als Immunstimulans

Durch die beschriebene in vitro Transkription (siehe 2.4.2.) wurden sense und antisense Stränge hergestellt und zu doppelsträngiger RNA verbunden. Alle RNA-Moleküle enthielten durch den Mechanismus der in vitro Transkription ein Triphosphat am 5'-Ende. Sowohl einzel- als auch doppelsträngige RNA induzierten ähnliche Mengen an Interferon- α in Monozyten. Wieder führte die Abspaltung des Triphosphats zur Aufhebung der Interferonantwort (Abbildung 10).

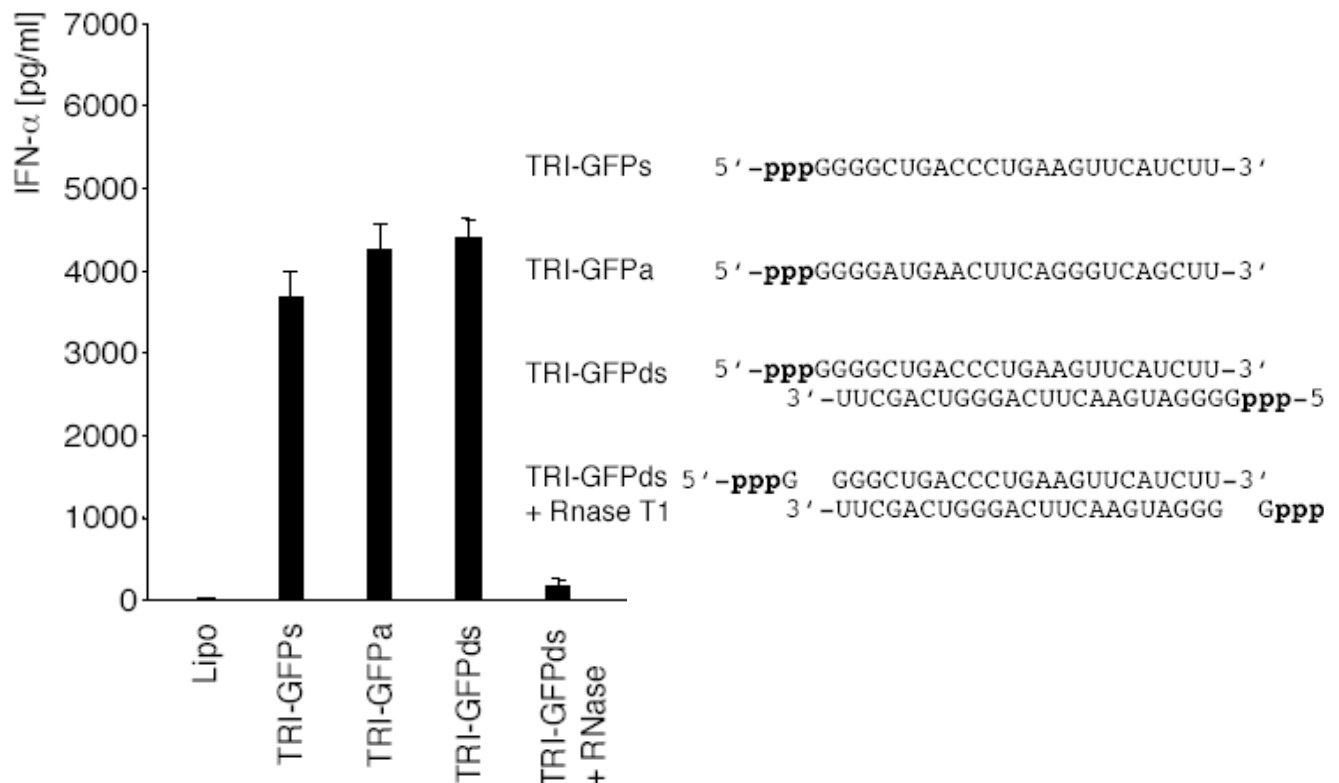


Abbildung 10:
Aufgereinigte Monozyten wurden mit einzel- (sense und antisense) und doppelsträngiger RNA transfiziert. In einen kleinen Teil der Wells wurde RNase T1 hinzugegeben, die zur Abspaltung des Triphosphats am 5'-Ende führt.

3.3.3. Längenabhängigkeit der Immunstimulation durch Triphosphat-RNA

Weiter wurde der Einfluss der Länge der Oligonukleotide auf die immunstimulatorische Aktivität untersucht. Dazu wurden 27 Basen lange Moleküle vom 3'-Ende schrittweise um drei Nukleotide verkürzt bis zu einer minimalen Länge von 9 Nukleotiden. Während Moleküle aus 27, 24, und 21 Nukleotiden starke Interferon-Antworten induzierten, war ab einer Länge von kleiner gleich 18 Nukleotiden ein deutlicher Abfall der Aktivität sichtbar (Abbildung 12).

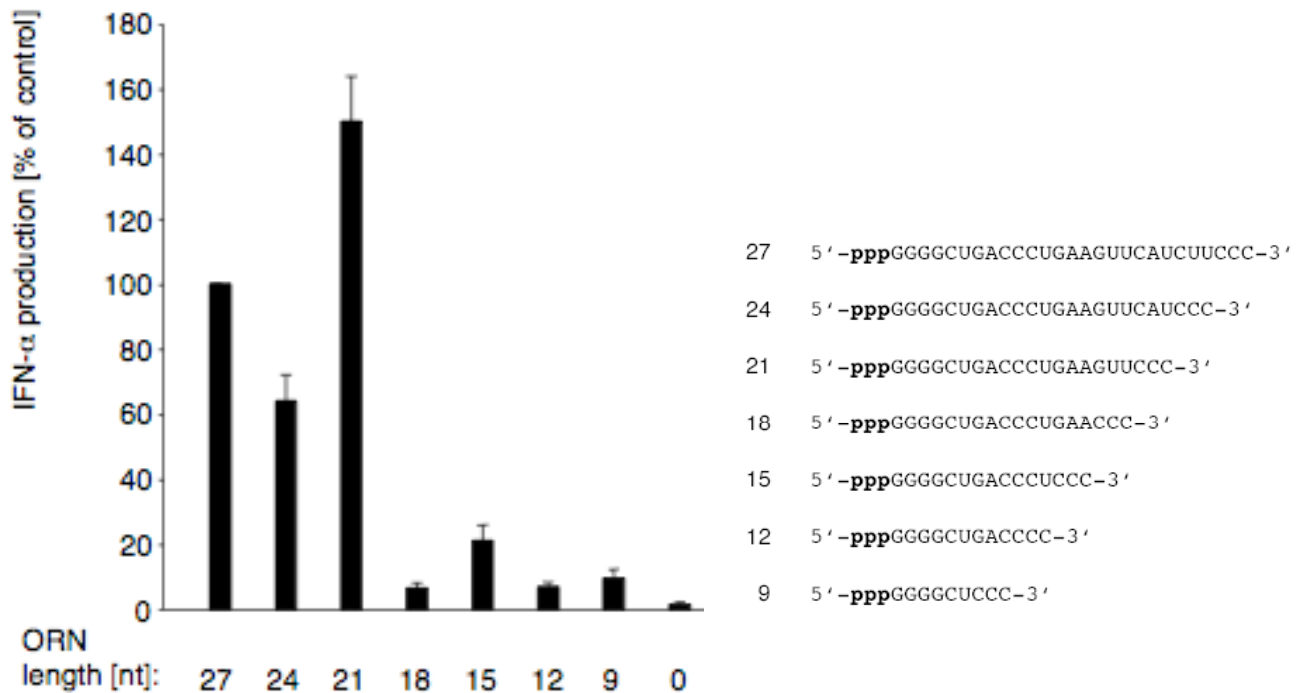


Abbildung 12:

Nukleinsäuren in einer Länge zwischen 27 und 9 Nukleotiden, die durch die graduelle Verkürzung eines 27mers in Schritten von 3 Basenpaaren hergestellt wurden, wurden in Monozyten transfiziert. Die Interferon- α -Produktion in Monozyten mehrerer unabhängiger Spender wurde zur Interferon-Antwort bei 27meren normalisiert und als Mittelwerte \pm SEM zusammengefasst.

3.3.4. Aufhebung der Interferon-Induktion durch Triphosphat-RNA-Capping

Weiter untersuchten wir den Einfluss eines 7-Methyl-Guanosin-Caps auf die Interferon-Induktion durch Triphosphat-RNA. Dazu wurden RNA-Moleküle verschiedener Länge zum Teil in Gegenwart synthetischer Cap-analoger N-7-Methyl-Guanosin-Gruppen hergestellt. Im Anschluss wurden RNA-Oligonukleotide mit und ohne Cap in Monozyten transfiziert. RNA-Oligonukleotide, die in Cap-Analoga enthaltenden Ansätzen synthetisiert wurden und die etwa zu 80 % eine N-7-Methyl-Guanosin-Gruppe trugen, induzierten in Monozyten weit weniger Interferon- α als synthetisch hergestellte Triphosphat-RNA ohne Cap (Abbildung 13).

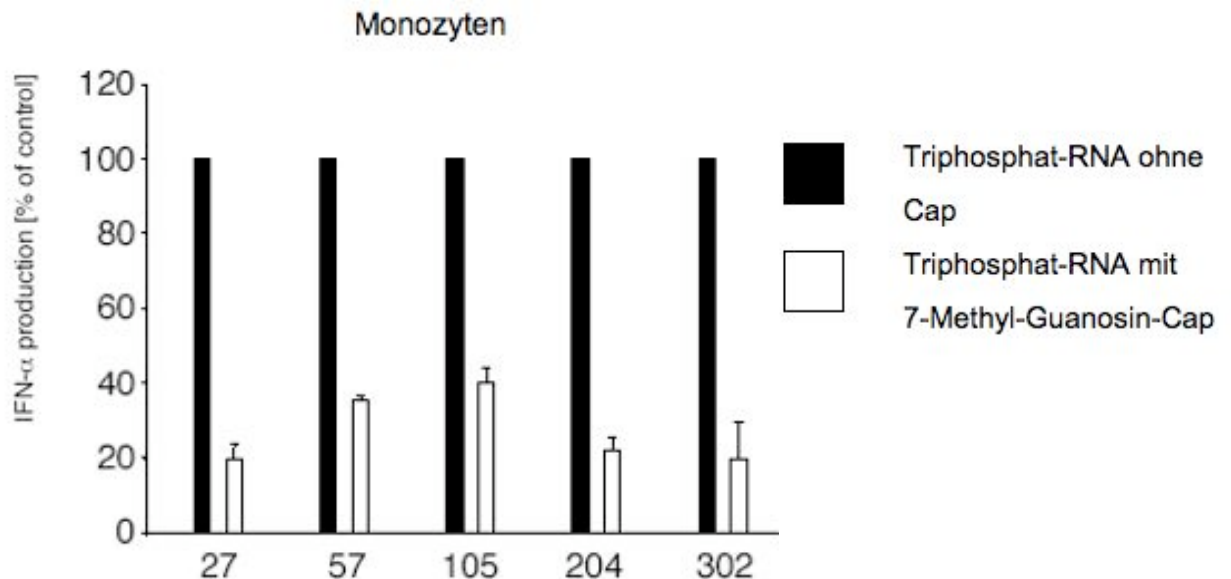


Abbildung 13:

RNA-Moleküle unterschiedlicher Länge (27, 57, 204, 302 Nukleotide) wurden in Gegenwart von Cap-analogen N7-Methyl-Guanosin-Gruppen (leere Balken) oder Nukleosidtriphosphaten ohne Methylgruppe (schwarze Balken) transkribiert und in Monozyten transfiziert.

3.4. Bedeutung der RNA-Helikase RIG-I

3.4.1. RIG-I-abhängige Triphosphat-RNA-vermittelte Interferon-Induktion

In folgenden Experimenten wurde die Bedeutung von RIG-I im Zusammenhang mit Interferoninduktion durch Triphosphat-RNA untersucht. Humane embryonale Nieren-293-Zellen (HEK-293), die entweder mit RIG-I Wildtyp (RIG-I full), RIG-I mit fehlender CARD-Domäne (RIG-IC, siehe 1.2.3.4.), punktmutiertes RIG-I (RIG-IK207A) oder einem leeren Vektor transfiziert wurden, stimulierten wir mit R848, synthetischer 5`-OH-RNA (9.2s) oder Triphosphat-RNA (tri-9.2s). Während die beiden erst genannten Stimulantien keine Antwort induzieren konnten, kam es nach Applikation der Triphosphat-RNA zu einer starken Interferon-Induktion (Abbildung 14). Dabei fiel die Antwort in Gegenwart von punktmutiertem RIG-I auf etwa ein Drittel im Vergleich zum Wildtyp ab, ohne CARD-Domäne war die Antwort kaum höher als ohne RIG-I.

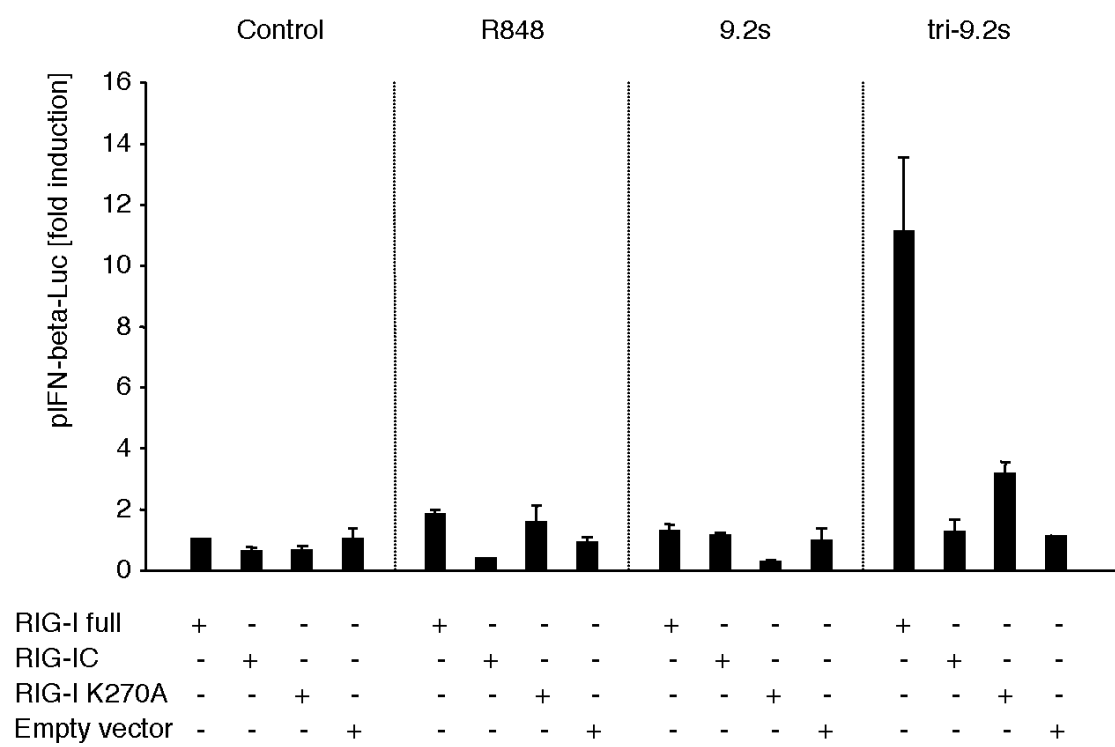


Abbildung 14:
HEK-293-Zellen wurden entweder mit RIG-I-Wildtyp (RIG-I full), RIG-IC, RIG-IK207A oder dem korrespondierenden leeren Vektor und dem Reporterplasmid pIFN-beta-Luc transfiziert. Zusätzlich erfolgte keine weitere oder die Applikation von je 300 ng R848, synthetischer tri-9.2s-RNA oder in vitro transkribierter 9,2s-RNA. Die Reporterassays wurden 24 Stunden nach Transfektion analysiert, die Ergebnisse zu den Kontrollen ohne Vektor normalisiert und stellen Mittelwerte +/- SEM dar.

3.4.2. RIG-I-vermittelte Interferon-Induktion durch exogene und endogene Triphosphat-RNA

Um Interferon-Induktion auch durch in vivo transkribierte RNA zu untersuchen, setzten wir ein System ein, das Template-abhängig die Transkription von RNA im Zytosol von mit T7 Polymerase transfizierten Zellen erlaubt. So wurde bei Koexpression von RIG-I und dem Wildtyp der T7-Polymerase - ohne den Zusatz exogener RNA - in HEK-293-Zellen eine starke Interferon-Typ-I-Expression gemessen. Alternativ zu RIG-I-Wildtyp (RIG-I full) wurde mutiertes RIG-I ohne CARD-Domäne (RIG-IC) transfiziert: in den entsprechenden Ansätzen war keine Interferon-Induktion mehr nachweisbar. Ein vergleichbares Bild zeigt sich bei der Expression von RIG-I Wildtyp in Gegenwart von punktmutierter T7 Polymerase (T7D812N). Am höchsten war die Interferon-Induktion bei gleichzeitigem Vorliegen eines Template mit einem Promotor für T7 Polymerase (polymerase promotor-containing template, pBKS), RIG-I-Wildtyp und T7 Polymerase-Wildtyp (Abbildung 15 und 16). Wurde die T7 Polymerase-Dosis reduziert, so war ein Anstieg der Spezifität der RIG-I-abhängigen Interferon-Induktion zu beobachten (Abbildung 15).

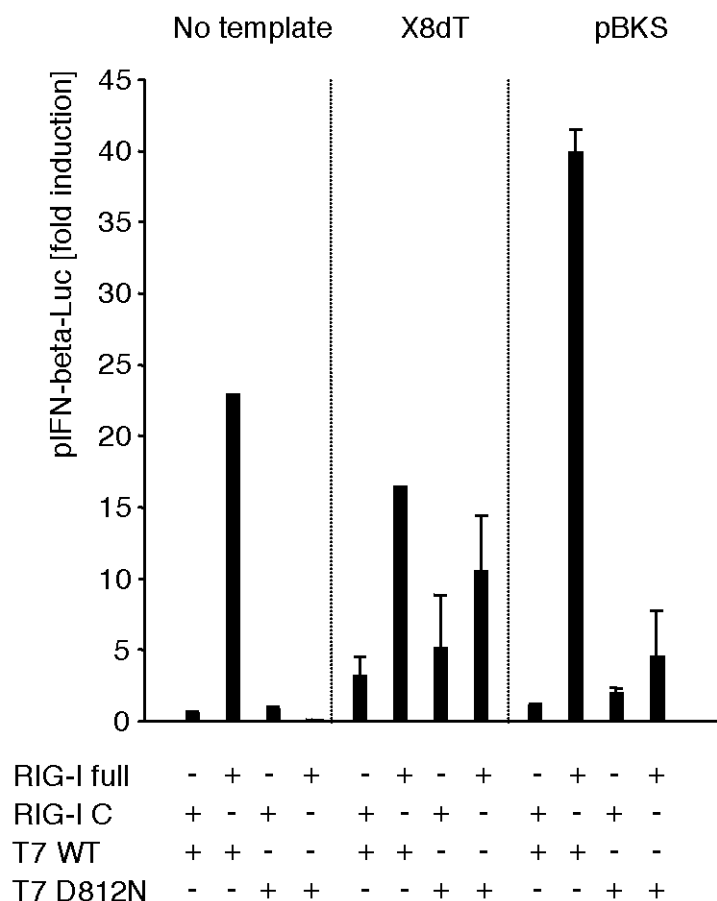


Abbildung 15:
HEK-293-Zellen wurden entweder mit RIG-I-Wildtyp oder RIG-IC (je 200 ng) und T7 Polymerase oder transkriptionell inaktiver punktmutierter T7 RNA Polymerase D812N (je 300 ng) sowie pINF-beta-Luc und pSV-β-Galactosidase (400 ng) transfiziert; zusätzlich nichts weiter, X8dt (ein Vektor pBKS ohne T7 Polymerase-Promotor) oder pBKS (je 300 ng). 24 Stunden nach Transfektion wurde die Interferon-Induktion über die Bestimmung der Reporter-Aktivität in Luciferase-Assays bestimmt.

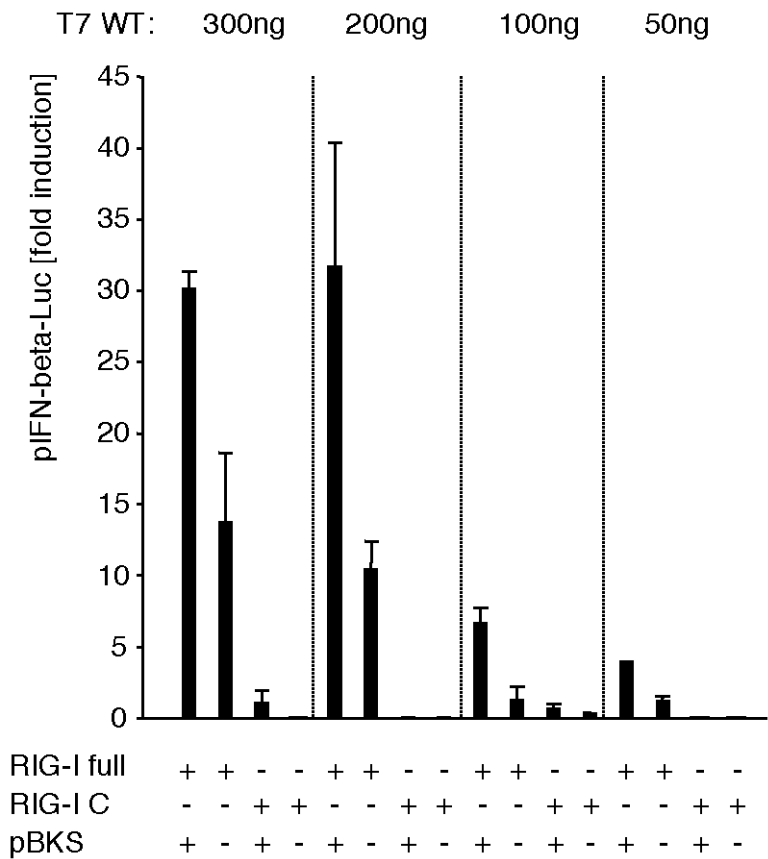


Abbildung 16:
HEK-293-Zellen wurden mit sinkenden Dosen T7 Polymerase in Gegenwart von RIG-I-Wildtyp oder RIG-IC (200 ng) mit oder ohne pBKS (300 ng) zusammen mit pINF-beta-Luc (300 ng) und pSV-β-Galactosidase (400 ng) transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde die Luciferase-Aktivität analysiert. Die Daten sind normalisiert zu RIG-IC/pBKS/T7 Polymerase-Situation als Mittelwert +/- SEM dargestellt.

4. Diskussion

4.1. Übersicht über die experimentellen Ergebnisse

Unsere Experimente konnten eine Interferon-Typ-I-Induktion nachweisen, die abhängig von einer strukturellen Voraussetzung ist: ein 5'-ständiges Triphosphat. Dieser Induktions-Mechanismus ist dabei TLR-unabhängig. Monozyten und nicht plasmazytoide dendritische Zellen, die bislang als die klassischen Interferon-Produzenten gehandelt wurden, konnten als Hauptproduzenten bei Stimulation primärer Blutzellen identifiziert werden.

Der aktive Ligand konnte ebenfalls genauer charakterisiert werden: mit einem 5'-Triphosphat-Ende wirkt sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige RNA immunstimulatorisch; auf die Interferon-Induktion scheint das 3'-Ende dabei keinen Einfluss zu haben. Zur wirksamen Interferon-Induktion ist eine minimale Länge von über 18 Nukleotiden erforderlich. *Capping* hebt die immunstimulatorische Aktivität des 5'-ständigen Triphosphats auf.

Weiter konnten wir zeigen, dass der beobachteten Mechanismus von der RNA-Helikase RIG-I abhängig ist; dabei führte sowohl exogen als auch endogen hergestellte Triphosphat-RNA bei Koexpression dieses Proteins in HEK-293-Zellen zu einer starken Interferon-Typ-I-Antwort. In späteren Versuchen der Arbeitsgruppe bestätigte sich dieser Befund: Auch RIG-I-*Knockout*-Mäuse ließen sich nicht mehr durch Triphosphat-RNA aktivieren.

4.2. Ergebnisinterpretation im Vergleich mit der Literatur

4.2.1. Charakterisierung des Liganden

4.2.1.1. Strukturabhängigkeit

Wir konnten die Abhängigkeit des immunstimulatorischen Effekts der untersuchten RNA von strukturellen Voraussetzungen zeigen: Dephosphorylierung der 5'-Triphosphat-RNA, also zum Beispiel die enzymatische Abspaltung des endständigen Triphosphats durch eine Rnase, führt zur Aufhebung ihrer Fähigkeit Interferone zu induzieren. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Interferon-Induktion durch das Triphosphat vermittelt wird, es sich also um eine Triphosphat-abhängige Interferon-Induktion handelt. Unterstrichen wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass *Capping*, also Maskierung des Triphosphats durch eine 7-Methyl-Guanosin-Gruppe, zu einer deutlich reduzierten Interferon-Antwort führt. Der erste Hinweis auf eine Triphosphat-vermittelte Interferon-Induktion durch kurze RNA-Moleküle kam 2004 von Kim et al.. Auf diese Arbeit aufbauend konnten wir 2006 das Triphosphatende als spezifischen Liganden eines zytosolischen Proteins beschreiben. 2007 beobachteten Plumet et al. ebenfalls die Bedeutung dieser strukturellen Voraussetzung für die RIG-I-vermittelte Interferon-Antwort nach Masern-Virus-Infektion.

Etwa zeitgleich mit unseren Ergebnissen publizierte die Gruppe um Pichlmair eine Phosphat-, allerdings nicht Triphosphat-abhängige Interferon-Induktion durch einzelsträngige RNA aus Influenza-Viren. Sie zeigten ebenfalls die Bedeutung des 5'-ständigen Phosphats als strukturellen Schlüssel für die zytosolische Signalvermittlung (Pichlmair et al. 2006). Auch wir konnten eine Interferon-Induktion durch einzelsträngige RNA, sowohl Sense als auch Antisense-Strang, beobachten, so lange die RNA-Moleküle ein 5'-ständiges Triphosphat trugen. In weiteren Versuchen konnten wir zeigen, dass ein Mono- oder Diphosphat an Stelle des Triphosphats am 5'-Ende in Monozyten kein Interferon induzieren kann (Hornung et al. 2006). Auf die Bedeutung dieser in Zusammenschau der Literatur wohl unstrittigen phosphat-abhängigen, durch einzelsträngige in vitro synthetisierte RNA-Oligonukleotide vermittelten Interferon-Induktion wird im Verlauf der Diskussion eingegangen.

Davon abzugrenzen ist längere doppelsträngige RNA: 2008 publizierten Kato et al. eine Triphosphat-unabhängige, längenabhängige RIG-I-vermittelte Interferonantwort, die bevorzugt durch mehrere 100 Basen-lange Moleküle hervorgerufen wird. So könnte

5'-Triphosphat – dessen Beschreibung das Verständnis RIG-I-vermittelter Erkennungsmechanismen revolutionierte (Hornung et al. 2006) – nicht der einzige RIG-I-Ligand sein. Allerdings zeigte die Arbeit von Kato et al. nicht klar, dass nach enzymatischer Verkürzung doppelsträngiger RNA der daraus entstehende RIG-I-Ligand kein Triphosphat-Ende mehr enthielt und kann an diesem Punkt durchaus In Frage gestellt werden. Soweit der Erkenntnisstand 2008 – 2009 ergänzten zwei Arbeiten entscheidend das Verständnis der RIG-I-Ligandenstruktur: Die Gruppen um Rothenfusser und Hartmann konnten zeigen, dass neben dem 5'-ständigen Triphosphat ein doppelsträngiger Nukleinsäureabschnitt zur RIG-I-vermittelten Interferon-Induktion notwendig ist (Schmidt et al. 2009, Schlee et al. 2009). Im Gegensatz zu unserer Arbeit setzten sowohl Schmidt als auch Schlee et al. chemisch synthetisierte Triphosphat-RNA ein. Sie zeigten außerdem, dass kollateral entstehende RNA-Abschnitte bei in vitro Synthese von RNA die Ligandenstruktur darstellen und erklären so frühere Ergebnisse; eine funktionelle Analyse der erst genannten Gruppe von in vitro hergestellter RNA ergab, dass template-unabhängig, durch die T7 Polymerase entstehende Hairpin-RNA wohl als Immunstimulans wirkt.

4.2.1.2. Sequenzabhängigkeit

In orientierenden Versuchen zur Frage einer besonders immunstimulatorischen Sequenz erschien das Interferon-Induktionspotential der Triphosphat-Oligonukleotide unabhängig von der 3'-Sequenz.

In einer folgenden Arbeit wurde in einzelsträngiger RNA aus Hepatitis C Virus (HCV) ein Polyuridin-Motiv im Bereich des hoch konservierten, nicht translatierten 3'-Endes als besonders potentes Pathogen-assoziiertes molekulares Pattern (PAMP) für die Erkennung durch RIG-I beschrieben. Auch in weiteren RNA-Viren wie Influenza-, Masern- oder Ebolavirus, die bekanntermaßen RIG-I aktivieren, konnten ähnliche Homopolyuridin- und –adeninsequenzen als Schlüsselsequenzen in der RIG-I-vermittelten Immunmodulation identifiziert werden (Saito et al. 2008). Ein 5'-Triphosphat war zwar notwendig, entgegen unseren Beobachtungen allerdings nicht hinreichend für eine starke Interferon-Induktion. Voraussetzung waren in der Arbeit von Saito et al. daneben die homopolymere Ribonukleotidsequenz, eine lineare Struktur und eine Länge von mindestens 50 Nukleotiden. In dieser Publikation wird also ein spezifisches homopolymeres RNA-Motiv innerhalb des Genoms von HCV oder anderen RNA-Viren als von RIG-I erkanntes molekulares Muster definiert. Auch durch die von Kim et al. publizierte Triphosphat-*green fluorescent protein*-RNA sowie durch

die von uns eingesetzten getesteten Oligonukleotide, die kleiner gleich 50 % A/U-Nukleotide enthielten, konnten Saito et al. eine deutliche, aber schwächere Interferon-Induktion in ihrem experimentellen Setting erzielen. Es ist wahrscheinlich, dass ein homopolymeres Poly(U)-Ende die Ausbildung von doppelsträngiger RNA begünstigt und sich die Ergebnisse von Saito et al. so erklären lassen.

Eine zweite Arbeit illustriert die Bedeutung einer sequenzabhängigen, triphosphat-vermittelten Interferon-Induktion: Gondai et al. beschrieben 2008 einen negativen Effekt mit steigender Anzahl von Guanosin am 5'-Ende von in-vitro transkribierter RNA. Bereits diese Ergebnisse unterstreichen, dass unsere Arbeit, die zentrale Rolle des Triphosphats bei der RIG-I-vermittelten Interferon-Induktion klar zeigt, wichtiger Ausgangspunkt einer viel versprechenden Entwicklung hoch immunogener Moleküle mit großer klinischer Relevanz geworden ist.

4.2.1.3. Längenabhängigkeit

In unseren Versuchen zeigte sich die Notwendigkeit einer minimalen Länge der RNA-Oligonukleotide von über 18 Nukleotiden um die Triphosphat-vermittelte Interferon-Induktion auszulösen. In jüngeren Publikationen zum Einfluss der Länge immunmodulatorischer RNA auf RIG-I-vermittelte Interferon-Induktion fällt auf, dass vor allem das andere Extrem, also die Potenz langer RNA untersucht wurde. Sicherlich mitbegründend für diesen „Trend“ sind bereits länger bekannte Mechanismen und Stimulantien wie etwa Poly I:C als synthetisches Analogon für doppelsträngige RNA und klassischer TLR3-Aktivator (Alexopoulou et al. 2001), die sich als Ausgangspunkt neuer Untersuchungen anbieten. Außerdem sind seit Jahren die genaue Einordnung von MDA-5, dessen essentielle Rolle bei der TLR3-vermittelten Interferon-Induktion in vivo beschrieben wurde (Kato et al. 2006), und die Abgrenzung zu RIG-I Gegenstand vieler Studien. In diesem Zusammenhang zeigten Kato et al., dass 50 - 1000 Nukleotide lange RNA etwa aus Paramyxoviren von RIG-I erkannt wird, wobei längere Moleküle nicht untersucht wurden. Zu diesem Zeitpunkt wurde eher eine strukturelle als längenabhängige „Ligandenaufteilung“ zwischen MDA-5 und RIG-I postuliert. 2008 publizierte die selbe Gruppe eine „Längenpräferenz“ für RIG-I-Liganden im Bereich von 300 - 1000 Nukleotiden, während MDA-5 präferentiell Moleküle über 1000 Basenpaare bindet (Kato et al. 2008). Auch hier wurden wieder strukturelle Differenzen – etwa der Einfluss von 5'-ständigem Triphosphat einzelsträngiger RNA wie im Replikationszyklus von Influenza-Virus – eingeräumt.

Bei der Beurteilung verschiedener Studien zur Immunstimulation durch kurze RNA muss das experimentelle Setting kritisch beurteilt werden: So beschrieb die Gruppe um Marques 2006 eine Interferon-Induktion durch doppelsträngige Oligonukleotide (25 oder 27 Basenpaare) ohne Triphosphat-Überhang in einer Glioblastomzelllinie. Während diese Zellen ein bekanntermaßen leicht induzierbares Interferon-System besitzen, war eine entsprechende Interferon-Induktion aber beispielsweise in 293-T-Zellen aber nicht reproduzierbar.

Takahasi et al. beobachteten keine Interferon-Induktion durch 25 Basenpaare lange doppelsträngige RNA ohne Überhang; allerdings konnte eine 5'-Monophosphat- oder eine 3'-Monophosphat-Modifikation mit 2 Basen Überhang am 3'-Ende der RNA immunstimulatorisches Potential vermitteln. Auch hier führte ein 5'-ständiges Triphosphat zur Interferon-Induktion durch einzelsträngige RNA entsprechender Länge (Takahasi et al. 2008).

Saito et al. beschrieben in ihren Sequenzstudien Motive von größer gleich 50 Basenpaaren als minimale immunstimulatorische Länge (Saito et al. 2008).

Festzuhalten ist, dass in vielen Studien die Trennung zwischen Motiv- und Längenabhängigkeit nicht konsequent eingehalten wird. Dies erschwert differenzierte Aussagen. Außerdem differieren die Versuchsbedingungen und Systeme in hohem Maße und erschweren so den direkten Vergleich.

4.2.2. Charakterisierung zur Interferon-Induktion führenden Mechanismen

4.2.2.1. Bedeutung von Toll-like-Rezeptoren

TLR3 erkennt lange doppelsträngige RNA sowie seinen synthetischen „Standardliganden“ Poly I:C (Alexopoulou et al. 2001). Bereits 2004 postulierten Kariko et al. eine TLR3-abhängige Interferon-Induktion durch siRNA. Ihre Daten basierten auf Versuchen in HEK-293-Zellen, in denen sie nach TLR3-Überexpression einen vierfachen Anstieg der Interferon-Antwort beobachteten. Allerdings könnte die Überexpression von TLR auch nur indirekt zu einer verstärkten Interferon-Antwort durch siRNA beitragen, etwa durch Hochregulation zytosolischer RNA-Rezeptoren. So sezernieren beispielsweise TLR3-überexprimierende HEK-293-Zellen mehr IL-8 als Zellen mit leerem Vektor (Kariko et al. 2004).

TLR7 – ein zweiter TLR, der in Zusammenhang mit RNA-Erkennung bekanntermaßen eine wichtige Rolle spielt – bindet einzelsträngige RNA (Diebold et al 2004). 2005 beschrieben Hornung et al. eine TLR7-abhängige Interferon-Induktion in peripheren dendritischen Zellen durch small interfering RNA. Anders als in unseren Versuchen ist die TLR7-vermittelte Immunstimulation allerdings nicht an die strukturelle Voraussetzung eines endständigen Triphosphats gebunden. Unterstrichen wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass die Interferon-Induktion eben gerade nicht am stärksten in den mit TLR7 ausgestatteten, klassischen Interferon-produzierenden Zellen abläuft (siehe auch 4.2.3.). Den endgültigen Beweis für die Unabhängigkeit des beschriebenen Mechanismus von TLR7 lieferten unsere Versuche an *Knockout*-Mäusen: sie zeigten eine entsprechende Interferon-Induktion durch Triphosphat-RNA mit und ohne TLR7. Diese TLR7-unabhängige Interferon-Induktion impliziert die Beteiligung eines anderen PRR, der Triphosphat-Oligonukleotide als seinen PAMP erkennt und Immunstimulation vermittelt.

4.2.2.2. Einfluss endosomaler Reifung

Eine weitere Herangehensweise bei der Untersuchung des *Toll-like*-Rezeptor-Einflusses auf den beschriebenen Mechanismus ist Bestimmung der Abhängigkeit von endosomaler Reifung. Die vier TLR, die an der Erkennung von Nukleinsäure beteiligt sind, nämlich TLR3, 7, 8 und 9 sind in endosomaler Membran lokalisiert; TLR3 findet sich zusätzlich in der Zellmembran. Während die drei erst genannten TLR RNA detektieren, erkennt TLR9 unmethylierte CpG-Motive in DNA (Hemmi et al. 2000). Die Gruppe um Judge beschrieb 2005 in ihren Studien zu immunstimulatorischem Effekt von siRNA eine Hemmung durch Chloroquin. Dieser Hemmstoff endosomaler Reifung (Chloroquin verhindert eine Ansäuerung des Endosoms, die Voraussetzung für dessen Ausreifung ist) führte zu einer Aufhebung der Immunstimulation, was impliziert, dass die molekulare Erkennung von small interfering RNA am Endosom abläuft. Sioud et al. bestätigten im selben Jahr – wenn auch in differierendem Setting - eine durch Chloroquin unterbindbare Interferon-Induktion.

In unseren Versuchen konnten wir nachweisen, dass Triphosphat-RNA-vermittelte Interferon-Induktion nicht nur ohne TLR7, sondern auch unabhängig von endosomaler Reifung abläuft. Während die TLR9 –abhängige CpG-Detektion durch Chloroquin blockiert war, führte Triphosphat-RNA unabhängig von der applizierten Chloroquin-Dosis zu gleichbleibender Induktion von Interferon- α . Diese Beobachtung unterstreicht nicht nur die Ergebnisse unserer TLR7-*Knockout*-Versuche, sondern legt zudem einen

TLR8 und besonders TLR9- unabhängigen Mechanismus nahe. Während die Beobachtungen von Judge und Sioud in Versuchen mit siRNA ohne einem 5`-ständigem Triphosphat auf einem TLR-vermittelten Signalweg beruhen, lassen unsere Ergebnisse also auf eine von endosomalen Strukturen unabhängige, zytosolische RNA-Erkennung schließen.

4.2.2.3. Bedeutung von RIG-I

Diese Ergebnisse lenkten unser Augenmerk von den TLR auf zytosolischer Nukleinsäure-Detektoren, deren Bedeutung wir in weiteren Experimenten untersuchten. Protein-Kinase R zählt sicherlich zu den am längsten bekannten Sensoren zytoplasmatischer RNA (Sledz et al. 2003); allerdings scheinen doppelsträngige RNA-Oligonukletide unter 30 Basenpaare zu kurz für diesen Erkennungsmechanismus zu sein. Jünger ist die Kenntnis der Rolle der zytosolischen Helikase RIG-I im Zusammenhang mit antiviralen Mechanismen (Yoneyama et al. 2004). Marques et al. beschrieben 2006 kurze doppelsträngige RNA als RIG-I-Liganden, nachdem Kato et al. im selben Jahr lange doppelsträngige RNA favorisierten.

Die Gruppe um Kim et al. setzte wie auch in unseren Versuchen Triphosphat-RNA ein und beschrieb als erste eine Interferon-Induktion durch diese Oligonukleotide (Kim et al. 2004), ließ allerdings die Frage nach den zur Interferon-Induktion führenden Mechanismen offen.

In unseren Versuchen konnten wir eine deutliche Abhängigkeit der Interferon-Induktion durch Triphosphat-RNA von RIG-I zeigen: Nur in Gegenwart dieser Helikase war in HEK-293-Zellen nach Stimulation eine Interferon-Antwort messbar; dabei führte eine Punktmutation von RIG-I zu einem quantitativen Abfall auf etwa ein Drittel, ohne CARD-Domäne konnte RIG-I praktisch keine Immunmodulation vermitteln. Diese Daten suggerieren eine entscheidende Rolle der CARD-Domäne in der Triphosphat-induzierten Signalvermittlung und unterstreichen etwa die These von Meylan et al. zur RIG-I-abhängigen Interferon-Antwort (Meylan et al. 2005).

Mit diesen Beobachtungen konform gehen unsere Ergebnisse in RIG-I-Knockout embryonalen Mausfibroblasten: Im Gegensatz zu Wildtypzellen konnte Triphosphat-RNA hier nicht immunstimulatorisch wirken (Hornung et al. 2006).

Wenn 5`-Triphosphat-RNA wirklich von RIG-I erkannt wird, ist zu erwarten, dass auch endogen synthetisierte Nukleinsäure mit einem Triphosphat Interferon-Induktion

vermittelt. Wir konnten zeigen, dass durch Überexpression von T7 Polymerase und den Einsatz von Templates und Nukleinsäurebausteinen sowie RIG-I-Expression ohne den Zusatz weiterer Nukleinsäure eine bedeutende Interferon-Antwort auslösbar war. Auch hier war die Interferon-Antwort durch unvollständiges oder punktmutiertes RIG-I wieder deutlich vermindert. Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht nur exogen entstandene, sondern auch endogen synthetisierte Triphosphat-RNA durch RIG-I erkannt wird. Nebenbei konnte so bestätigt werden, dass keine Kontaminationen in exogen hergestellten Ribonukleinsäuren an der Interferon-Induktion beteiligt sind.

Wie die Erkennung im Detail abläuft, konnten wir in so genannten Pull-down-Assays zeigen: 5'-Triphosphat-RNA-Oligonukleotide mit einer 3'-Biotin-Markierung bildeten Präzipitate mit RIG-I; dabei kam es zur Bindung zwischen Triphosphatende und RIG-I (Hornung et al. 2006).

4.2.2.4. Einfluss von Capping der Triphosphat-RNA

Da Viren schon auf Grund ihres Lebenszyklus aus den gleichen molekularen Bestandteilen wie ihre Wirtszellen zusammengesetzt sind - nämlich Protein und Nukleinsäuren - sind spezifische molekulare Charakteristika zur Differenzierung zwischen Virus und Wirt von besonderer Bedeutung.

Grundsätzlich besitzt sowohl jede körpereigene als auch virale RNA, die beide Produkte einer RNA Polymerase sind, direkt nach der Herstellung ein 5'-Triphosphat. Allerdings findet in Eukaryoten die RNA-Synthese im Zellkern statt und vor der Freisetzung der Nukleinsäuren ins Zytoplasma laufen zahlreiche Modifikationen ab. *Capping* der endständigen Phosphatgruppe etwa ist charakteristisch für die Prozessierung von zelleigener mRNA: Dabei wird im ersten von mehreren Schritten eine 7-Methylguanosingruppe – entsprechend dem *Capping* in unseren Versuchen - an das 5'-Triphosphat der entstehenden mRNA geheftet. In diesem Prozess wird die aus dem Zellkern stammende RNA markiert und kann nicht mehr immunstimulatorisch wirken. Dieser physiologische Prozess ist Grundlage unserer Experimente mit gecappter RNA. Der kritische Leser mag an unseren Daten eine Interferon-induzierende Restaktivität nach *Capping* der RNA-Oligonukleotide bemerken – etwa 20 % der RNA-Oligonukleotide blieben aus technischen Gründen ungecappt und erklären diese Beobachtung.

Messenger RNA von Viren, die eukaryotische Zellen infiziert, trägt gewöhnlicher Weise ein gecapptes 5'-Ende; dennoch treten während der RNA-Synthese verschiedener Viren Zwischenformen mit ungecapptem Triphosphat am 5'-Ende auf. So beginnen die

Transkripte aller Plus-Strang-RNA-Viren der Familie der Flaviviren mit einem ungecappten Triphosphat. Mit der hier vertretenen These konform wurde für alle Vertreter dieser Erregergruppe eine Erkennung durch RIG-I beschrieben (Chang et al. 2006, Kato et al. 2006, Sumpter et al. 2005) - Voraussetzung zur Induktion von Interferon nach dem beschriebenen Mechanismus. Diese Beobachtungen legen eine Bedeutung des 5'-Triphosphats als molekularer Marker zur Unterscheidung von körpereigener und fremder wie viraler RNA durch das angeborene Immunsystem nahe. Diese Struktur scheint also eine molekulare Basis zur Differenzierung zwischen eigener, im Zellkern entstandener, und fremder RNA darzustellen. Allerdings gibt es mehrere Transkripte der RNA Polymerase III wie beispielsweise 7SL-RNA - ein Polymerase III-Produkt, das für den intrazellulären Transport von Proteinen zuständig und folglich im Zytosol zu finden ist - die ebenfalls ein 5'-ständiges Triphosphat tragen - ein Hinweis darauf, dass neben dem Triphosphat noch weitere (strukturelle) Charakteristika die Unterscheidung zwischen selbst und fremd ermöglichen könnten. Interessante Ergebnisse lieferten auch Versuche zum Einfluss von Basenmodifikationen in Triphosphat-Oligonukleotiden: Wurde Uridin durch Pseudouridin oder 2-Thiouridin ersetzt, kam es zu einem deutlichen Abfall der Interferon-Induktion, ähnlich war das Bild nach dem Ersatz von Uridin-5'-Triphosphat (UTP) durch 2'-O-methyliertem-UTP (Hornung et al. 2006). Diese Beobachtungen zeigen wiederum, dass die immunstimulatorische Aktivität von Triphosphat-RNA durch häufige posttranskriptionelle Modifikationen wie auch derartige Basenveränderungen abnimmt und ebenfalls für die Unterscheidung zwischen selbst und fremd von Bedeutung sind.

Abbildung 17 zeigt das seit den 2009 erschienen Arbeiten von Schmidt et al. und Schlee et al. gültige Modell der RIG-I-Aktivierung nach Erkennung körperfremder zytoplasmatischer RNA ebenso wie wichtige Eigenschaften dieses Liganden. Die Kenntnis der genauen immunmodulatorischen Struktur erlaubt die gezielte Synthese von Molekülen zur Induktion reproduzierbarer antiviraler Aktivität und damit therapeutischen Einsatz.

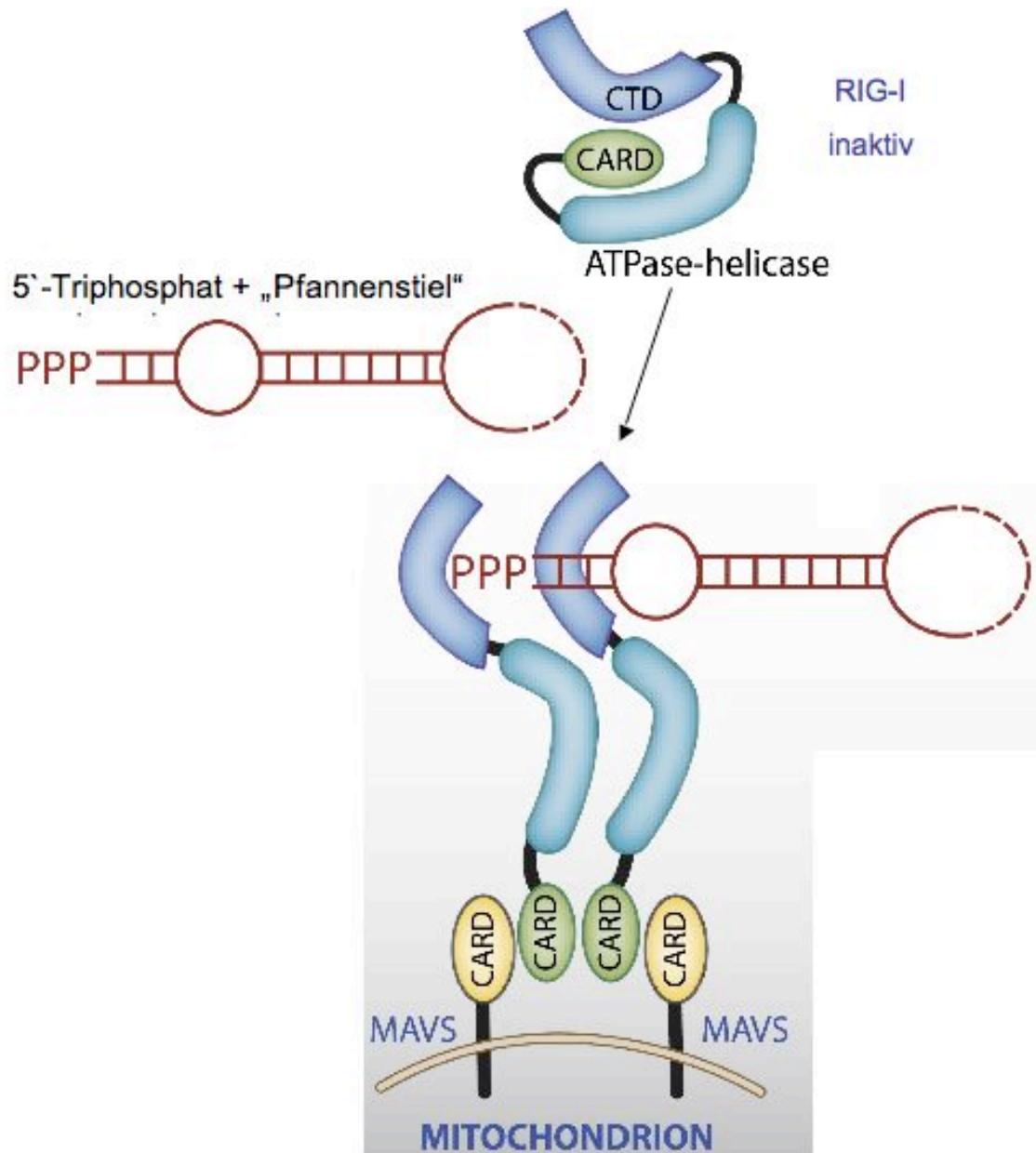


Abbildung 17: **RIG-I-Aktivierung durch RNA** (nach Fujita 2009)

In nicht infizierten Zellen ist RIG-I inaktiv; die Inaktivierung entsteht durch intramolekulare Interaktion zwischen der C-terminalen Repressordomäne (*C-terminal domain*, CTD) und der CARD-Domäne. Erscheint fremde RNA mit den nötigen strukturellen Voraussetzungen, erkennt RIG-I diese spezifisch über die CTD. Die Bindung führt es zu einer Konformationsänderung von RIG-I und zur Exposition der CARD-Domäne, die wiederum an MAVS (synonym IPS-1, VISA, Cardif) bindet und die Immunantwort so in Gang setzt.

5'-Triphosphat-RNA-Oligonukleotide brauchen einen kurzen doppelsträngigen Abschnitt („Pfannenstiel“) um mit RIG-I zu assoziieren um dann wiederum über die CARD-Domäne den Signalweg fortzusetzen. Diese doppelte strukturelle Voraussetzung führt zu einer spezifischen Fremderkennung und antiviralen Immunantwort.

4.2.3. Hauptproduzenten im peripheren Blut

Melchjorsen et al. publizierten 2005, dass angeborene Immunität gegenüber Paramyxovirus zelltypspezifisch über verschiedene PRR vermittelt wird; dabei ist ausschließlich RIG-I für die Immunstimulation in Nicht-Immunzellen verantwortlich. Kato et al. beschrieben eine zelltypspezifische RIG-I-Beteiligung, für die sie allerdings – ohne zwischen „klassischen Abwehrzellen“ und anderen Zelltypen zu unterscheiden – eine Abhängigkeit sowohl in Fibroblasten als auch in myeloischen dendritischen Zellen nachweisen konnten; die Interferon-Induktion in PDC dagegen war RIG-I-unabhängig (Kato et al. 2005).

Unsere Versuche zur Identifikation der potentesten Interferon-produzierenden Zellsubpopulation führten uns zu den Monozyten. Diese Ergebnisse zeigen also, dass – entgegen des bisher gültigen Dogmas – PDC bei den untersuchten Mechanismen nicht als Hauptproduzenten von Interferon- α fungieren. Vielmehr scheinen Monozyten die Rolle der Hauptproduzenten zu spielen – eine äußerst spannende Beobachtung, da zum Zeitpunkt dieser experimentellen Arbeit Interferonproduktion in primären Monozyten noch nicht beschrieben war.

Kennt man retrospektiv den RIG-I-abhängigen Mechanismus der Triphosphat-vermittelten Interferon-Induktion, sind die Daten mit den Ergebnissen von Kato et al. vereinbar und erklären das Ausbleiben einer messbaren Interferon-Antwort nach Stimulation von PDC mit den untersuchten Oligonukleotiden.

Kato et al. konnten bereits 2005 zeigen, dass RIG-I-*Knockout*-Mäuse bereits im Embryonalstadium auf Grund von Leberdegeneration sterben und eröffneten damit die Diskussion über eine weitere Rolle von RIG-I, nämlich Entwicklungsregulation neben viraler Detektion. Sehr interessant sind auch die Beobachtungen von Zang et al.: Die Gruppe beschreibt eine signifikante RIG-I-Induktion während der Granulozytendifferenzierung bei akuter myeloischer Leukämie; weiter postulieren sie, dass ein Ausfall des RIG-I-Gens zur Entwicklung myeloproliferativer Erkrankungen führt und belegen eine bedeutende Rolle von RIG-I in der Entwicklung und Differenzierung von Granulozyten (Zang et al. 2008).

4.4. Klinische Bedeutung

Nach einer Infektion mit Hepatitis C – einem Virus, von dem weltweit beinahe 200 Millionen Menschen infiziert sind – wird die Immunreaktion in der Leber durch RIG-I vermittelt. Weiterführende Studien konnten bezüglich der von RIG-I erkannten viralen Struktur, dem Pathogen-assoziierten molekularen Pattern (PAMP), erste Erkenntnisse liefern (Saito et al. 2008). Hier kann die Entwicklung von Impfadjuvantien oder Immuntherapie ansetzen. Poek et al. publizierten 2008 vielversprechende Ergebnisse zum Einsatz von Triphosphat-RNA in der Melanomtherapie (siehe auch 5.2.).

Im Hinblick auf mögliche Resistenzmechanismen enthält die 2008 von Habjan et al. erschienene Arbeit interessante Beobachtungen: Verschiedene RNA-Viren prozessieren ihr 5'-Ende und umgehen so RIG-I-vermittelte Interferon-Induktion: Auch diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von RIG-I als zentraler intrazellulärer Rezeptor zur Detektion der meisten Negativ-Strang-RNA-Viren. Allerdings zeigte die Gruppe um Habjan die Abspaltung des 5'-ständigen Triphosphats als einen eigenen viralen Mechanismus um der angeborenen Immunantwort „zu entkommen“. Hepatitis C Virus kodiert eine Protease, die das zentrale Adapterprotein Cardif spaltet und unterbindet so eine RIG-I-abhängige Immunantwort (Meylan et al. 2005). Sumpter et al. beobachteten, dass nach Hepatitis C-Infektion in Zellen mit defektem RIG-I eine Interferon-Antwort ausblieb und nur in diesen Zellen Virusreplikation möglich war (Sumpter et al. 2005).

5. ZUSAMMENFASSUNG

5.1 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde ein immunstimulatorischer Effekt einer *in vitro* transkribierten *small interfering* RNA untersucht. Dabei wurden verschiedene Eigenschaften des Liganden, also des RNA-Oligonukleotids, die zu einer besonders potenten Interferon-Induktion führen, ermittelt. Außerdem konnte der Mechanismus zwischen Stimulation und Interferon näher charakterisiert werden. Die Versuche wurden an primären Blutzellen sowie an HEK-293-Zellen, einer humanen Zelllinie, durchgeführt.

Wir konnten die Abhängigkeit der Interferon-Induktion von einem 5'-ständigen Triphosphat zeigen. Nach experimenteller Abtrennung der Triphosphat-Gruppe war keine Interferon-Antwort mehr messbar. In weiteren Versuchen maskierten wir das 5'-Ende durch ein *Cap*, eine 7-Methyl-Guanosin-Gruppe, und bestätigten so diese strukturelle Voraussetzung: ohne Triphosphat war die Interferon-Induktion wiederum aufgehoben.

War ein 5'-ständiges Triphosphat vorhanden, konnte doppelsträngige wie einzelsträngige RNA als Sense- und Antisense-Strang ähnlich wirksam Interferon induzieren. Ebenfalls ohne Einfluss auf die immunstimulatorische Potenz der RNA-Oligonukleotide erschien die 3'-Sequenz in unseren – bezüglich der Fragestellung allerdings nur orientierenden - Versuchen. Als minimale Oligonukleotid-Länge zur potenten Interferon-Induktion konnten wir 21 Nuklotide ermitteln.

In mehreren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Induzierbarkeit der Interferon-Antwort unabhängig von *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) ist. Dies ergaben Experimente an TLR7-*Knockout*-Mäusen. Weiter beobachteten wir keinen Einfluss endosomaler Reifung auf die Triphosphat-RNA-abhängige Immunstimulation und folgerten vielmehr eine zytoplasmatisch ablaufende Nukleinsäureerkennung.

Entgegen des bisher gültigen „Dogmas“ konnten durch Auftrennung mononukleärer Blutzellen in Subpopulationen Monozyten und nicht plasmazytoide dendritische Zellen (PDC) als Hauptproduzenten von Interferon identifiziert werden. Auch diese Beobachtung deckt sich mit unseren Ergebnissen zum Erkennungsmechanismus, da die Interferon-Antwort in PDC bekannter Maßen TLR-abhängig ist.

In Versuchen zur Rolle eines zytosolischen RNA-Sensors war in HEK-293-Zellen nur bei Expression der intakten Helikase *Retinoic acid inducible gene-1* (RIG-I) nach Stimulation mit Triphosphat-RNA Interferon-Induktion messbar. Dabei konnte die

Abhängigkeit der Interferon-Antwort von RIG-I sowohl bei Stimulation durch exogene als auch endogene Triphosphat-RNA gezeigt werden.

In Zusammenschau unserer Ergebnisse konnten wir die Bedeutung des Triphosphats als strukturelle Basis einer Selbst-Fremd-Differenzierung begreifen. So gelingt die zelluläre Erkennung verschiedener Viren. Deren Nukleinsäuren werden von der zytosolischen Helikase RIG-I erkannt und versetzen den Organismus durch Interferon-Induktion in einen antiviralen Status. Diese Daten erlauben synthetische Liganden für die zytosolische Helikase RIG-I herzustellen, was ein interessanter, innovativer Ansatz in der Immuntherapie infektiöser oder maligner Erkrankungen sein könnte.

5.2 Bedeutung und Ausblick

Nach viraler Infektion ist eine schnelle angeborene Immunantwort entscheidend. Dabei spielen *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) und *Retinoic acid-inducible gene I-like* Helikasen (RLH) als *Pattern-recognition-Rezeptoren* (PRR) bei verschiedenen Virusinfektionen und möglicherweise abhängig vom Infektionsweg verschiedene Rollen. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal Interferon- α -Induktion in bedeutendem Maße in myeloischen Zellen durch Nukleinsäuren gezeigt: 5'-Triphosphat-Oligonukleotide waren die ersten Moleküle, die potent eine aktive virale Infektion mimen können und sind so als Immunstimulantien auch in anderen Zelltypen verheißungsvoll. Vergleichbare Interferonlevel konnten bislang nur durch Stimulation mit attenuierten Viren und Inkaufnahme aller damit verbundenen Risiken erzielt werden. In diesem Zusammenhang scheint Triphosphat-RNA sehr viel versprechend in der Weiterentwicklung von Vaccinen und Immuntherapie. Hier können weitere Studien an erste Daten wie die von Poeck et al. 2008 anknüpfen. Außerdem ist zum besseren Verständnis eine noch genauere strukturelle Aufklärung der RLH-Liganden RIG-I und MDA-5 entscheidend.

Dass unsere Erkenntnisse Ausgangspunkt zahlreicher Weiterentwicklungen sind, unterstreicht schon heute die seit 2006 deutlich wachsende Zahl an Publikationen zu RIG-I und Triphosphat-RNA. Drei folgende Arbeiten sollen exemplarisch einen Eindruck der aktuellen „Forschungstrends“ und therapeutischen Hoffnungen vermitteln: Poeck et al. setzten Triphosphat-RNA mit dem Ansatz immuntherapeutischer Melanombehandlung ein; dabei konnten sie durch die Aktivierung von RIG-I auf Immun- und Tumorzellebene einen starken antineoplastischen Effekt auslösen (Poeck et al. 2008). Den Gruppen um Rothenfusser und Hartmann gelang es, die von RIG-I erkannte molekulare Struktur weiter zu definieren: Sie zeigten, dass neben dem 5'-ständigen Triphosphat ein doppelsträngiger Nukleinsäureabschnitt zur RIG-I-vermittelten Interferon-Induktion notwendig ist (Schmidt et al. 2009, Schlee et al. 2009). Auch diese Arbeit ist ein viel versprechender Ansatz, dessen Weiterentwicklung die gezielte antivirale und antineoplastische Therapie vorantreiben könnte. Besonders reizvoll erscheint die Kombination des spezifischen (Silencing) und unspezifischen (Immunstimulation) Effekts unserer Triphosphat-Oligonukleotide.

6. Literaturverzeichnis

- Aderem A L.** The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(25):13766-13771.
- Akira S.** Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2003; 278:38105-38108.
- Akira S,** Hoshino K. Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in toll-like receptor signaling. *J Infect Dis* 2003; 187 Suppl 2:356-363.
- Akira S,** Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124:783-801.
- Alexopoulou L,** Holt A C, Medzhitov R, Flavell R A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413(6857):732-738.
- Anderson K V,** Nüsslein-Volhard C. Information for the dorsal-ventral pattern of *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* 1984; 311:223-227.
- Arch R H,** Gedrich R W, Thompson C B. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) - a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev* 1998; 12:2821-2830.
- Barton G M,** Medzhitov R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:380-383.
- Bauer S,** Wagner H. Bacterial CpG-DNA licenses TLR9. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 270:145-154.
- Beutler B,** Rietschel E T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:169-176.
- Breiman A,** Grandvaux N, Rontugan L, Ottone C, Akira S, Yoneyama M, Fujita T, Hiscott J, Meurs E F. Inhibition of RIG-I-Dependent Signaling to the Interferon Pathway during Hepatitis C Virus Expression and Restoration of Signaling by Ikkε. *Journal of Virology* 2005; 7:3967-3978.
- Chang T H,** Liao C L, Lin Y L. Flavivirus induces interferon-beta gene expression through a pathway involving RIG-I-dependent IRF-3 and PI3K-dependent NF-kappaB activation. *Microbes Infect* 2006; 8(1):157-171.
- Chu W M,** Ostertag D, Li Z W, Chang L, Chen Y, Hu Y, Williams B, Perrault J, Karin M. JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity* 1999; 11(6):721-731.
- Chuang T,** Ulevitch R J. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochem Biophys Acta* 2001; 1518(1-2):157-161.
- Diebold S,** Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis C, Reis S. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004; 303(5663):1529-1531.
- Dorsett Y,** Tuschl T. siRNAs: Applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nature* 2004; 3:318-329.
- Du X,** Poltorak A, Wei Y, Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11(3):362-371.
- Dunne A,** O'Neill L A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003; (171):re3.

- Engvall V.** Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT. *Methodes Enzymol* 1980; 70:419-439.
- Fire A,** Xu S, Montgomery M K, Kostas S A, Driver S E, Mello C C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391(6669):806-811.
- Fitzgerald K A,** Rowe D C, Barnes B J, Caffrey D R, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha P M, Golenbock D T. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 2003; 198(7):1043-1055.
- Fujita T.** A nonself RNA pattern: tri-p to panhandle. *Immunity* 2009; 31(1):4-5.
- Ghosh S,** May M J, Kopp E B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998; 16:225-260.
- Gitlin L,** Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell R A, Diamond M S, Colonna M. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:8459-8464.
- Gondai T,** Yamaguchi K, Miyano-Kurosaki N, Habu Y, Takaku H. Short-hairpin RNAs synthesized by T7 phage polymerase do not induce interferon. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(3):e18.
- Habjan M,** Andersson I, Klingström J, Schümann M, Martin A, Zimmermann P, Wagner V, Pichlmair A, Schneider U, Mühlberger E, Mirazimi A, Weber F. Processing of Genome 5' Termini as a Strategy of Negative-Strand RNA Viruses to Avoid RIG-I-Dependent Interferon Induction. *PLoS ONE* 2008; 3(4):e2032.
- Hartmann G,** Krieg A M. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 2000; 164(2): 944-953.
- Hashimoto C,** Hudson K L, Anderson K V. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; 52(2):269-279.
- Heil F,** Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303(5663):1526-1529.
- Hemmi H,** Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408(6813):740-745.
- Honda A,** Mizumoto K, Ishihama A. Identification of the 5' terminal structure of influenza virus genome RNA by a newly developed enzymatic method. *Virus Res* 1998; 55(2):199-206.
- Hornung V,** Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, Poek H, Akira S, Conzelmann K K, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5'-Triphosphate is the ligand for RIG-I. *Science* 2006; 314:997-1001.
- Hornung V,** Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fougères A, Endres S, Hartmann G. Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005; 11(3):263-270.
- Hornung V,** Schlender J, Guenther-Biller M, Rothenfusser S, Endres S, Conzelmann K K, Hartmann G. Replication dependent IFN- α induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus. *Journal of Immunology* 2004; 173:5935-5943 (JIF 6.7).

- Janeway C A.** The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 1992; 13(1):11-16.
- Janeway C A,** Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu R Immunol* 2002; 20:197-216.
- Janeway C A,** Travers P, Walport M, Sholmchik M J. Immunobiology: the immune system in health and disease, 6th Edition. *Churchill Livingstone* 2005.
- Janssens S,** Burns K, Tschopp J, Beyaert R. Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr Biol* 2002; 12(6):467-471.
- Judge A D,** Sood V, Shaw J R, Fang D, McClintock K, MacLachlan I. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 2005; 23(4):457-462.
- Kaisho T,** Takeuchi O, Kawai T, Hoshino K, Akira S. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166(9):5688-5694.
- Karikó K,** Bhuyan P, Capodici J, Weissman D. Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3; *J Immunol* 2004; 172(11):6545-6549.
- Karin M,** Neriah B Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:621-663.
- Kato H,** Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O, Akira S. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 2005; 23(1):19-28.
- Kato H,** Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, Hiiragi A, Dermody T S, Fujita T, Akira S. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* 2008; 205(7):1601-1610.
- Kato H,** Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Matusi K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii K J, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh C S, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S. Differential roles of MDA-5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006; 441:101-105.
- Kawai T,** Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999; 11(1):115-122.
- Kawai T,** Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt P F, Sato S, Hoshino K, Akira S. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 2001; 167(10):5887-5894.
- Kawai T,** Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii K J, Takeuchi O, Akira S. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and MDA-5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 2005; 6(10):981-988.
- Kim D-H,** Longo M, Han Y, Lundberg P, Cantin E, Rossi J. Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotechnol* 2004; 22(3):321-325.
- Krug A,** Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas Z K, Endres S, Krieg A M, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31(7):2154-2163.

- Kumagi Y**, Takeuchi O, Kato H, Kumar H, Matsui K, Morii E, Aozasa K, Kawai T, Akira S. Alveolar macrophages are the primary interferon- α producer in pulmonary infection with RNA viruses. *Immunity* 2007; 27:240-252.
- Lemaitre B**. The road to Toll. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(7):521-527.
- Lemaitre B**, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J M, Hoffmann J A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86(6):973-983.
- Lien E**, Nilsen N J, Espevik T, Golenbock D T. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2005; 5:190-198.
- Marques J T**, Devosse T, Wang D, Zamanian-Daryoush M, Serbinowski P, Hartmann R, Fujita T, Behlke M A, Williams B R. A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2006; 24(5):559-565.
- Medzhitov R**, Preston-Hurlburt P, Janeway C A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388(6640):394-397.
- Melchjorsen J**, Jensen S B, Malmgaard L, Rasmussen S B, Weber F, Bowie A G, Matikainen S, Paludan S R. Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner. *J Virol* 2005; 79(20):12944-12951.
- Meylan E**, Curran J, Hofmann K, Moradapour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J. Cardif is an adapter protein in the RIG-I antiviral pathway and it is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005; 437(7062):1167-1172.
- Moynagh P N**. TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF- κ B pathway. *Trends in Immunology* 2005; 9:469-476.
- Nomura N**, Miyajima N, Sazuka T, Tanaka A, Kawarabayasi Y, Sato S, Nagase T, Seki N, Ishikawa K, Tabata S. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. *DNA Res* 1994; 1(1):27-35.
- Oshiumi H**, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon- β induction. *Nat Immunol* 2003a; 4(2):161-167.
- Oshiumi H**, Sasai M, Shida K, Fujita T, Matsumoto M, Seya T. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon- β . *J Biol Chem* 2003b; 278:49751-49762.
- Peiser L**, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2002; 14(1):123-128.
- Pichelmair A**, Schulz O, Tan C P, Naslund T I, Liljestrom P, Weber F, Reis e Sousa C. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-triphosphates. *Science* 2006; 314:997-1001.
- Plumet S**, Herschke F, Bourhis J-M, Valentin H, Longhi S, Gerlier D. Cytosolic 5'-Triphosphate Ended Viral Leader Transcript of Measles Virus as Activator of the RIG I-Mediated Interferon Response. *PLoS ONE* 2007; 14;2(3):e279.
- Poeck H**, Besch R, Maihoefer C, Renn M, Tormo D, Morskaya SS, Kirschnek S, Gaffal E, Landsberg J, Hellmuth J, Schmidt A, Anz D, Bscheider M, Schwerdt T, Berking C, Bourquin C, Kalinke U, Kremmer E, Kato H, Akira S, Meyers R, Häcker G, Neuenhahn M, Busch D, Ruland J, Rothenfusser S, Prinz M, Hornung V, Endres

- S, Tüting T, Hartmann G. 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and RIG-I activation against melanoma. *Nat Med* 2008; 14(11):1256-1263.
- Poltorak A**, He X, Smirnova I, Liu M Y, Huffel C V, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282(5396):2085-2088.
- Porstman T**, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques. An overview. *J Immunol Methods* 1992; 150:5-21.
- Qureshi S T**, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore K J, Gros P, Malo D. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 1999; 189(4):615-625.
- Radecke F**, Spielhofer P, Schneider H, Kaelin K, Huber M, Dötsch C, Christiansen G, Billeter MA. Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J* 1995; 14(23):5773-84.
- Rock F L**, Hardiman G, Timans J C, Kastelein R A, Bazan J F. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(2):588-593.
- Saito T**, Owen D M, Jiang F, Marcotriangio J, Gale M Jr. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* 2008; 454:523-527.
- Schlee M**, Roth A, Hornung V, Hagmann C A, Wimmenauer V, Barchet W, Coch C, Janke M, Mihailovic A, Wardle G, Juranek S, Kato H, Kawai T, Poeck H, Fitzgerald K A, Takeuchi O, Akira S, Tuschl T, Latz E, Ludwig J, Hartmann G. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* 2009; 31(1):25-34.
- Schmidt A**, Schwerd T, Hamm W, Hellmuth JC, Cui S, Wenzel M, Hoffmann FS, Michallet MC, Besch R, Hopfner KP, Endres S, Rothenfusser S. 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009.
- Seth R B**, Sun L, Ea C K, Chen Z J. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 2005; 122(5):669-682.
- Sharma S**, tenOever B R, Grandvaux N, Zhou G P, Lin R, Hiscott J. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 2003; 300(5622):1148-1151.
- Sioud M**. Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J Mol Biol* 2005; 348(5):1079-1090.
- Sledz C A**, Holko M, de Veer M J, Silverman RH, Williams B R. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 2003; 5(9):834-839.
- Sumpter R Jr**, Loo Y M, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, Lemon S M, Gale M Jr. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* 2005; 79(5):2689-2699.
- Sun Y W**. RIG-I, a human homologue gene of RNA helicase, is induced by retinoic acid during the differentiation of acute promyelocytic leukemia cell. Thesis, Shanghai Second Medical University 1997.

- Williams M J**, Rodriguez A, Kimbrell D A, Eldon E D. The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *Embo J* 1997; 16(20):6120-6130.
- Taguchi T**, Mitcham J L, Dower S K, Sims J E, Testa J R. Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the *Drosophila* transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. *Genomics* 1996; 32(3):486-488.
- Takahasi K**, Yoneyama M, Nishihori T, Hirai R, Kumeta H, Narita R, Gale M Jr, Inagaki F, Fujita T. Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol Cell* 2008;29(4):428-440.
- Takeda K**, Akira S. Toll-like receptors innnate immunity. *Int.Immunol.* 2005; 17:1-14.
- Takeuchi O**, Kawai T, Sanjo H, Copeland N G, Gilbert D J, Jenkins N A, Takeda K, Akira S. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* 1999; 231(1-2):59-65.
- Takeuchi O**, Takeda K, Akira S. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003; 4:1144-1150.
- Takeuchi O**, Akira S. MDA-5/RIG-I and virus recognition. *Current Opinion in Immunology* 2008; 20:17-22.
- Talpaz M**, McCredie KB, Mavligit GM, Gutterman JU. Leucocyte interferon-induced myeloid cyto reduction in chronic myelogenous leukaemia. *Blood* 1983; 62:689.
- Talpaz M**, Kantarjian HM, McCredie K et al.. Hematologic remission and cytogenetic improvement induced by recombinant human interferon-alpha A in chronic myelogenous leukaemia. *N Engl J Med* 1986; 314:1065.
- Xu L G**, Wang Y Y, Han K J, Li L Y, Zhai Z, Shu H B. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* 2005; 19(6):727-740.
- Yamamoto M**, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 2002a; 420(6913):324-329.
- Yamamoto M**, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003; 4(11):1144-1150.
- Yamamoto M**, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. Cutting Edge: A Novel Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter That Preferentially Activates the IFN-beta Promoter in the Toll-Like Receptor Signaling. *J Immunol* 2002b; 169(12):6668-6672.
- Yoneyama M**, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004, 5:730-737.
- Zhang N N**, Shen S-H, Jiang L-J, Zhang W, Zhang H-X, Sun Y-P, Li X-Y, Huang Q-H, Ge B-X, Chen S-J, Wang Z-G, Chen Z, Zhu J. RIG-I plays a critical role in negatively regulating granulocytic proliferation. *PNAS* 2008; 105(30):10553-10558.
- Zhang X**, Wang C, Schook L B, Hawken R J, Rutherford M S. An RNA helicase, RHIV-1, induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is mapped on porcine chromosome 10q13. *Microb Pathog* 2000; 28:267-278.

7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BSA	Bovines Serum-Albumin
CARD	Caspase-Recruitment-Domäne
CG	Cytosin-Guanin
CLR	<i>C-type lectin</i> -Rezeptoren
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
CTD	<i>C-terminal domain</i>
DC	Dendritische Zelle
DD	<i>Death domain</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
GFP	<i>Green fluorescence protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HCV	Hepatitis C Virus
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSA	Humanes Serum-Albumin
INF	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
IPC	<i>Professional type-1 interferon-producing cells</i>
IRAK 1/ 4	IL-1R-assoziierte Kinase 1/4
IRF-3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
LGP-2	<i>Laboratory of genetics and physiology 2</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MD-2	<i>Myeloid differentiation-2</i>
MDA-5	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
Mio	Million(en)
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
NLR	<i>Nucleotid-oligomerization domain-like</i> Rezeptoren
NOD	<i>Nucleotid-oligomerization domain</i>
ODN	Oligodesoxynukleotid
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerithrin
PEI	Poly-Ethylen-Imin

PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PHA	Phytohämagglutinin
PKR	Proteinkinase R
PRR	<i>Pattern-recognition-Rezeptor</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLH	<i>Retinoic acid-inducible gene I-like</i> Helikasen
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
TAK-1	<i>TGFβ activated kinase-1</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TIRAP	<i>TIR domain containing adapter protein</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TOPRO-3	To-Pro-3-Iodid
TRAF-6	TNFR-assoziiertes Faktor 6
TRAM	<i>TRIF related adapter molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adapter inducing IFN-β</i>
UTP	Uridin-5'-Triphosphat

8. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen Professoren und Mitarbeitern der Abteilung für Klinische Pharmakologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München sowie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, die die Entstehung dieser Dissertation begleiteten. Besonders hervorheben möchte ich Prof. Dr. med. Stefan Endres, der mir an jedem Ort der Welt mit wertvollem Rat zur Seite stand, Prof. Dr. med. Gunther Hartmann, der mir den Einstieg in die Arbeitsgruppe experimentelle Oligonukleotide ermöglichte sowie meinen direkten Betreuer Prof. Dr. med. Veit Hornung, der mir durch seinen engagierten Einsatz, vielseitige Forderung und Förderung den großen Reiz experimenteller Forschung vermittelte.

Weiter danken möchte ich Wolfgang Ellegast und Richard Engl für Lektüre und Korrektur dieser Arbeit aus wertvoller nicht medizinischer Perspektive.

9. Veröffentlichung

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Science 12 October 2006 / Science 10 November 2006: 994-997 als Originalarbeit veröffentlicht:

Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzózka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann K, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5`Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I.

10. Lebenslauf

- 5. Feb. 1983 Geburt in Nürnberg

- 1993-2002 Dom-Gymnasium Freising
 - Auslandsaufenthalte in Großbritannien, Frankreich, Australien
 - 2001/02 Facharbeit in Biologie am neurophysiologischen Institut der LMU München, ausgezeichnet vom Verband der Deutschen Biologen

- erfolgreiche Prüfung im Auswahlverfahren der Bayerischen Hochbegabtenförderung

- Okt. 2002 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der LMU München
 - Betreuung mehrerer Histologiekurse als studentische Assistentin
 - 2004 erfolgreiche Physikumsprüfung

- Okt. 2004 Wechsel an die Technische Universität München (TUM)
 - ab 07/ 05 experimentelle Doktorarbeit im Labor für Klinische Pharmakologie der LMU, Stipendiatin des Graduiertenkollegs (DFG) „Oligonucleotides in cell biology and therapy“
 - Famulaturen in Guatemala Ciudad (Guatemala), Wien (Österreich), San Francisco (USA), Chittoor (Indien)
 - Moderation des Seminars “Case Discussion Round” (Innere Medizin) als studentische Assistentin an der TUM
 - ab 08/ 07 Praktisches Jahr
 - 08-12/ 07 Innere Medizin als Stipendiatin des Cornell-Programms der TUM am New York Presbyterian Hospital / Memorial Sloan Kettering Cancer Center, USA
 - 12/07–03/08 Chirurgie am Universitätskrankenhaus Genf, Schweiz
 - 04-06/ 08 Neurologie am St Georges / St Helier Hospital (University of London) London, UK
 - 06-08/ 08 Neurologie am Klinikum rechts der Isar München
 - Nov. 08 BASICS Klinische Pharmakologie erschienen im Elsevier Verlag
 - Dez. 08 Approbation

- seit 2009 Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin III, Prof. Dr. med. H. Döhner, Universitätsklinikum Ulm